Análise Físico Química de Alimentos

Rui Carlos Zambiazi

Editora Poisson

Rui Carlos Zambiazi

Análise físico química de alimentos

2ª Edição

Belo Horizonte

Editora Poisson

2025

Editor Chefe: Dr. Darly Fernando Andrade

Conselho Editorial

Dr. Antônio Artur de Souza – Universidade Federal de Minas Gerais
MSc. Davilson Eduardo Andrade
Dra. Elizângela de Jesus Oliveira – Universidade Federal do Amazonas
MSc. Fabiane dos Santos
Dr. José Eduardo Ferreira Lopes – Universidade Federal de Uberlândia
Dr. Otaviano Francisco Neves – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Dr. Luiz Cláudio de Lima – Universidade FUMEC
Dr. Nelson Ferreira Filho – Faculdades Kennedy
MSc. Valdiney Alves de Oliveira – Universidade Federal de Uberlândia

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Z24 ZAMBIAZI, Rui Carlos

Análise físico química de alimentos/ Rui Carlos Zambiazi - Editora Poisson - Belo Horizonte - MG: Poisson, 2025

Formato: PDF
ISBN: 978-65-5866-572-4
DOI: 10.36229/978-65-5866-572-4

Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia

1.Química 2. Saúde I. ZAMBIAZI, Rui Carlos II. Título

CDD-614.018

Sônia Márcia Soares de Moura – CRB 6/1896

O conteúdo deste livro está licenciado sob a Licença de Atribuição Creative Commons 4.0.
Com ela é permitido compartilhar o livro, devendo ser dado o devido crédito, não podendo ser utilizado para fins comerciais e nem ser alterado.

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores.

Esse e outros títulos podem ser baixados gratuitamente em www.poisson.com.br
Entre em contato pelo contato@poisson.com.br

Autor

Rui Carlos Zambiazi

Possui graduação em Licenciatura em Química pela Universidade Federal de Santa Maria (1982), graduação em Química Industrial pela Universidade Federal de Santa Maria (1982), mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa (1987) e doutorado em Food and Nutritional Science - University of Manitoba- Canadá (1997). Atualmente é professor Titular da Universidade Federal de Pelotas. Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em análises físico químicas e análises cromatográficas em alimentos. Atua nas linhas de pesquisas de identificação, quantificação, avaliação da estabilidade e encapsulação de compostos bioativos.

SUMÁRIO

1. Introdução à análise de alimentos 9

1.1. Recomendações gerais no trabalho em laboratório 9

1.1.1. Regras gerais de segurança e procedimentos no laboratório 9

1.1.2. Procedimentos para pequenos acidentes 11

1.1.3. Natureza de alguns reagentes e solventes químicos 12

1.1.4. Local de armazenamento de produtos químicos e de solventes 13

1.1.5. Limpeza de material e utensílios de laboratório 13

1.2. Aspectos relacionados à amostragem 14

1.2.1. Tomada de amostras 14

1.2.2. Identificação e inspeção da amostra 16

1.2.3. Preparo da amostra para análise 16

Anexo I 18

Tabela 1.1 Códigos de riscos (R) de reagentes e/ou solventes 18

Tabela 1.2 Códigos de cuidados (S) para reagentes e/ou solventes 20

2. Aspectos relacionados aos métodos e erros de análises 22

2.1. Escolha do método analítico 22

2.2. Métodos oficiais de análise de alimentos 23

2.3. Erros relacionados à análise 23

2.3.1. Erros em medidas 23

2.3.2. Tipos de erros em uma análise 24

2.3.2.1. Erros determinados 24

2.3.2.2. Erros indeterminados 24

2.3.3. Erros de expressão de resultados 24

3. Tópicos em conversão de unidades e preparo de soluções 26

3.1. Sistema básico de unidades 26

3.2. Principais expressões de concentrações de soluções utilizadas na análise de alimentos 28

3.2.1. Síntese de alguns conceitos fundamentais 28

3.2.2. Expressão de concentrações 30

3.2.3. Preparo de soluções molar (M) e normal (N) 35

3.2.4. Fator de diluição 39

3.2.5. Padronização de soluções molar (M) e normal (N) 40

3.2.6. Noções básicas de estequiometria na análise de alimentos 42

SUMÁRIO

4. Determinações físico-químicas usuais em alimentos 44

4.1. Determinações físicas em produtos envasados 44

4.1.1. Vácuo 44

4.1.2. Espaço livre 44

4.1.3. Peso líquido 45

4.1.4. Peso drenado 45

4.1.5. Volume da fase aquosa 46

4.1.6. Análise visual da embalagem 46

4.2. Determinações físico-químicas em produtos alimentícios 46

4.2.1. Densidade (ρ) 46

4.2.2. Índice de refração e sólidos solúveis (°Brix) 48

4.2.3. Potencial hidrogeniônico (pH) 49

4.2.4. Acidez 50

4.2.4.1. Acidez titulável total (amostras hidrofílicas) 52

4.2.4.2. Acidez fixa 53

4.2.4.3. Acidez volátil 53

4.2.4.4. Acidez de amostras gordurosas (lipofílicas) 53

4.2.4.5. Acidez em graus Dornic (°D) 54

4.2.5. Cloretos 54

4.2.6. Teor de iodo em sal 55

4.2.7. Teor alcóolico 56

4.2.8. Teste qualitativo da peroxidase 57

5. Análises relacionadas com a composição proximal de alimentos 58

5.1. Umidade 58

5.1.1. Aquecimento em estufa comum 59

5.1.2. Aquecimento em estufa à vácuo 60

5.2. Teor de cinzas 61

5.3. Fibras 62

5.3.1. Fibra bruta 62

5.3.2. Fibra alimentar 64

5.4. Teor de gordura 67

SUMÁRIO

5.4.1. Método de Soxhlet 67
5.4.2. Método de Bligh & Dyer 68
5.4.3. Método de Mojonnier 69
5.4.4. Método de Gerber 70
5.5. Proteínas 71
5.6. Carboidratos 73
5.7. Valor energético 74

6. Análise gerais em alimentos 75
6.1. Determinação da identidade e qualidade da gordura 75
6.1.1. Colesterol 75
6.1.2. Composição em ácidos graxos 76
6.1.3. Índice de iodo 78
6.1.4. Índice de acidez 79
6.1.5. Índice de peróxidos 80
6.1.6. Índice de anisidina 82
6.1.7. Reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) 83
6.1.8. Absortividade específica de dienos e trienos conjugados 83
6.2. Determinação de açúcares e polissacarídeos 84
6.2.1. Açúcares totais (método Somogyi-Nelson) 85
6.2.2. Açúcares totais (método Lane Eynon) 86
6.2.3. Açúcares redutores (método Lane Eynon) 87
6.2.4. Açúcares não redutores (método Lane Eynon) 88
6.2.5. Amido (método Lane Eynon) 88
6.2.6. Pectina 89
6.3. Determinação de minerais 89
6.3.1. Sódio 90
6.3.2. Ferro 90
6.3.3. Cálcio 91

7. Análises relacionadas aos compostos bioativos 93
7.1. Determinação de substâncias bioativas 93
7.1.1. Preparo do extrato 93
7.1.2. Compostos fenólicos 94

SUMÁRIO

7.1.3. Flavonóides 96
7.1.4. Carotenóides 97
7.1.5. Clorofilas 98
7.1.6. Tocoferóis 100
7.2. Determinação da atividade antioxidante 100
7.2.1. DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) 101
7.2.2. ABTS [(2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] 103
7.2.3. FRAP (Ferric reducing antioxidant power) 104
7.2.4. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 105
7.3. Determinação de vitamina C 107
7.4. Digestão *in vitro* 108

8. Soluções, indicadores e curvas padrões utilizadas nas técnicas analíticas 109
8.1. Preparo das soluções 109
8.2. Padronização das soluções 122
8.3. Preparo de indicadores 129
8.4. Curvas de concentrações de padrões 131

Referências 138

CAPÍTULO

01 Introdução à análise de alimentos

1.1. RECOMENDAÇÕES GERAIS NO TRABALHO EM LABORATÓRIO

1.1.1. REGRAS GERAIS DE SEGURANÇA E PROCEDIMENTOS NO LABORATÓRIO PESSOAL

Usar sempre o material de proteção (luvas, óculos, máscaras) indicado para cada caso particular.

Usar jalecos adequados, de preferência em tecido de algodão, longo e fechado, sem bolsos inferiores, de comprimento adequado, evitar mangas muito compridas ou largas.

Proteger os pés, usando calçados adequados, bem fechados, evitando saltos e solados lisos.

Não comer, beber ou fumar no ambiente de trabalho.

Evitar o uso de excesso de acessórios como pulseiras, anéis, correntes.

Proteger os cabelos, especialmente quando compridos, amarrando-os ou colocando uma touca.

Manter boa postura em laboratório, evitando se inclinar sobre bancadas ou equipamentos, não trabalhar muito tempo na mesma posição.

Evitar o trabalho em laboratório quando estiver sozinho, principalmente quando for em horário fora do expediente normal de trabalho.

Em qualquer momento estar consciente do que estiver fazendo.

Ambiente

Manter sempre limpo e organizado o local de trabalho, evitando obstáculos inúteis que possam dificultar as análises.

Não usar qualquer material de laboratório para uso individual (como tomar água em béquer).

Não colocar as tampas dos frascos e pipetas diretamente sobre a bancada.

Ao derramar alguma substância sobre a bancada ou no chão, limpar imediatamente o local.

Não deixar sobre a bancada vidros quentes, se isto for necessário, avisar aos colegas de trabalho.

Nunca trabalhar ou aquecer tubos de ensaio com abertura dirigida contra si ou outra pessoa, sempre direcionar para o lado oposto ou interior da capela.

Sempre ligar o exaustor quando houver escape de vapores ou gases no laboratório.

Não trabalhar com material imperfeito ou trincados, principalmente vidros.

Após trabalhar com material tóxico, lavar bem as mãos, limpar o local de trabalho e os materiais utilizados.

Lubrificar com silicone (camada bem fina) toda e qualquer conexão em que há superfícies esmerilhadas (como tampas de dessecadores).

Não jogar nenhum material sólido dentro da pia, colocá-los em recipientes especiais para lixo.

Solventes orgânicos ou misturas de reações químicas devem obrigatoriamente serem colocados em recipientes especiais de coleta corretamente identificados.

Estar ciente da localização dos chuveiros de emergência, lavadores de olhos e extintores, e saber utilizá-los corretamente.

Em incêndio produzido por papel, madeira ou material que deixa brasa ou cinzas, usar água, sempre dirigindo o jato de água para a base do fogo.

Ao se retirar do laboratório, verificar se não há torneiras de água ou gás abertas, desligar todos os aparelhos, deixar os equipamentos limpos.

Evitar o trabalho prolongado em ambiente com excesso de ruídos provenientes de aparelhos do laboratório (como de digestores, capelas, moinhos).

Soluções, reagentes e solventes

Ler os rótulos dos reagentes com atenção e utilizar os mesmos com os devidos cuidados, respeitando os códigos de riscos (tabela 1.1, Anexo 1) e de cuidados (tabela 1.2, Anexo 1).

Tomar os cuidados necessários e trabalhar em capela de exaustão, com substâncias que exalam vapores e substâncias ácidas e básicas concentradas.

Quando for diluir ácidos fortes, adicionar com cuidado o ácido sobre a água e nunca a água sobre o ácido.

Ao preparar soluções que produzem vapores ou aquecimento, utilizar capela de exaustão.

Ao preparar reagentes, rotular imediatamente os frascos colocando a data de preparação.

Não trabalhar e não deixar frascos com inflamáveis próximos de chamas ou resistências elétricas.

Não aquecer substâncias voláteis ou combustíveis (como álcool, éter etílico, éter de petróleo e hexano) diretamente ao fogo, sempre usar mesa de aquecimento ou banho de água.

Não cheirar diretamente no recipiente contendo uma solução ou solvente.

Materiais inflamáveis ou tóxicos devem ser guardados em recipientes especiais em capela.

Algumas substâncias se alteram mesmo na temperatura ambiente, devendo ser conservadas em geladeira ou freezer.

Substâncias higroscópicas devem ser acondicionadas em dessecador.

Sempre pipetar utilizando peras de pipetagem ou pipetas automatizadas, nunca pipetar diretamente com a boca.

Não retornar os reagentes aos vidros originais, mesmo que não tenham sido utilizados.

Quando se trabalha em análise quantitativa, evitar pegar diretamente papel filtro ou recipientes previamente pesados; manipular preferencialmente com pinças adequadas.

1.1.2. PROCEDIMENTOS PARA PEQUENOS ACIDENTES

Qualquer acidente deve ser comunicado ao responsável do laboratório, e os casos mais graves devem ser levados imediatamente ao atendimento médico.

Procedimentos para queimaduras em chama ou com materiais aquecidos

Lavar em água corrente por longos períodos ou submergir o local afetado em água gelada.

Após pode-se aplicar compressas úmidas em bicarbonato de sódio a 3%, ou aplicar pomadas apropriadas (como picrato de butesin ou sulfodiazina de prata a 1%).

Procedimentos para queimaduras com reagentes químicos

Remover rapidamente a vestimenta atingida (quando o caso).

Lavar o local afetado em água corrente por longos períodos.

Evitar o uso de pomadas ou de outro tipo de material.

Quando ocorrer queimaduras com ácidos, deve-se lavar o local com água corrente e após com solução básica diluída, como a solução de bicarbonato de sódio a 2% (m/v).

Quando ocorrer queimadura com bases, deve-se lavar o local com água corrente e após com solução ácida diluída, como e de ácido bórico ou acético a 2% (m/v).

Se ocorrer queimaduras com fenol, deve-se lavar o local com álcool etílico.

Procedimentos para ferimentos leves

Remover todo material estranho presente no ferimento.

Aplicar algum antisséptico no local.

Proteger o ferimento com gaze asséptica.

Em caso de retenção de fragmentos de materiais (como vidro) no interior do ferimento, ou de cortes mais profundos, procurar imediatamente o atendimento médico.

Procedimentos em princípios de incêndio

Desligar conexões de gases (se estiverem sendo usadas).

Tentar abafar o fogo com objetos adequados. Os recipientes contendo líquidos devem ser cobertos com tela de amianto, ou outro objeto apropriado. Início de incêndio em sólidos utilizar água ou abafar com panos.

Não jogar água em fogo produzido por líquidos inflamáveis que não sejam miscíveis em água.

Sempre que possível apagar as chamas com extintores (espuma, pó químico ou CO2).

Não usar extintores de líquido em circuitos elétricos, usar sempre extintores de CO_2.

Em casos mais graves, comunicar imediatamente o responsável.

1.1.3. NATUREZA DE ALGUNS REAGENTES E SOLVENTES QUÍMICOS

Muitas substâncias, em exposições prolongadas, podem provocar a incidência de alterações carcinogênicas, mutagênicas, de úlceras nos pulmões, olhos e pele, e de alterações nas membranas mucosas e no sistema nervoso. Dentre elas enquadram-se:

Químicos tóxicos

Mercúrio - evitar o contato com a pele e não respirar seus vapores.

Asbestos (lã de vidro) - possui efeito carcinogênico e induz a problemas respiratórios; sempre usar luvas e máscara de segurança no seu manuseio.

Éteres e clorofórmio - afetam o sistema nervoso; portanto, evitar respirar seus gases, e trabalhar em capela ou ambiente bem ventilado.

Químicos inflamáveis e/ou explosivos

Éter etílico (tomar cuidado ao aquecer quando está armazenado por um período muito longo, pode ocorrer a formação de peróxidos).

Ácido perclórico (trabalhar com cuidado e sempre em capela).

Químicos corrosivos

Ácidos em geral: nítrico, sulfúrico, clorídrico, perclórico.

Bases fortes: hidróxido de sódio, de potássio e de amônio.

Substâncias sensíveis à luz

Deve-se trabalhar em ambiente com pouca luminosidade, utilizando frascos âmbar ou envolvidos com papel alumínio, sempre com tampa.

A maioria dessas soluções deve ser preparada no momento do seu uso, por serem estáveis por apenas pequeno período.

Preparar apenas a quantidade necessária para a análise, a sobra deve ser descartada.

Nunca aquecer estas substâncias, a não ser em casos específicos.

Exemplos

Soluções de iodo e de iodeto de potássio, soluções de nitrato de prata, permanganatos, clorofilas, carotenóides, tocoferóis, reagente Folin-Ciocaltaeu.

1.1.4. LOCAL DE ARMAZENAMENTO DE PRODUTOS QUÍMICOS E DE SOLVENTES

É imprescindível o conhecimento das informações disponíveis sobre os produtos químicos que serão armazenados (ler com cuidado as informações no rótulo).

Evitar excesso de reagentes / solventes em estoque; possuir um sistema ágil de controle procedendo a compra segundo a necessidade.

Estabelecer segregação adequada, separando segundo as características inerentes às substâncias e suas incompatibilidades.

Utilizar estantes, armários protegidos, refrigeração, ventilação e piso adequado.

Realizar o armazenamento em locais apropriados, recomendável para produtos inflamáveis, cancerígenos, mutagênicos, altamente voláteis e/ou com alta toxicidade.

Prover sistema de exaustão em locais ou armários especiais com ventilação ou exaustão apropriada.

1.1.5. LIMPEZA DE MATERIAL E UTENSÍLIOS DE LABORATÓRIO

De maneira geral os sólidos são descartados diretamente no lixo, e se contaminados, em recipientes adequados.

Os líquidos devem ser colocados em recipientes específicos para o descarte adequado, segundo o plano de descarte de resíduos do laboratório.

Lavar os utensílios e/ou vidrarias com esponjas adequadas ao formato dos materiais.

Lavar as vidrarias inicialmente com água corrente, após com detergente neutro (como Extran) e novamente com água; no final, sempre fazer o enxágue com água destilada.

Para materiais mais sujos, sempre deixar a vidraria submersa em água com detergente por algum tempo (pelo menos 4 horas) antes de efetuar a lavagem.

Para os utensílios com resíduos de material carbonizado, primeiro lavar com ácido clorídrico concentrado, após enxaguar com água corrente, e após realizar a lavagem.

Recipientes sujos com gordura, lavar inicialmente com acetona comercial (deixando em imersão por alguns minutos) ou com solução de hidróxido de potássio a 4%, e após realizar a lavagem com água.

Depois do material estar limpo, secar em estufa em temperaturas abaixo de 100 ^{0}C.

Obs. Alguns procedimentos especiais

Buretas, balões e demais materiais volumétricos: deixar secar em temperaturas inferiores a 45 ^{0}C; nunca colocar em estufa a altas temperaturas.

Para materiais metálicos (tipo cápsulas de metal), nunca usar ácidos ou bases fortes para lavá-los.

1.2. ASPECTOS RELACIONADOS À AMOSTRAGEM

A coleta da amostra constitui a primeira fase da análise do produto. A amostragem e as operações subsequentes com as amostras podem constituir-se em fontes de erro na análise de alimentos. A amostra de um material deve ser a mais idêntica possível à todas as propriedades intrínsecas do material do qual foi retirada; portanto, a homogeneidade do material é importante; e se heterogêneo, deve-se retirar uma amostragem que represente esta heterogeneidade.

Para que se reduza ao máximo o erro, é necessário seguir alguns passos fundamentais no momento da retirada de uma amostra e nos passos subsequentes de uma análise, tais como:

Identificar a população de onde a amostra será retirada.

Selecionar a amostra segundo uma metodologia adequada.

Manusear e preparar corretamente a amostra para a análise.

Definir uma metodologia de análise adequada.

Aferir equipamentos e preparar reagentes e soluções com cuidado.

Apresentar corretamente os resultados.

1.2.1. TOMADA DE AMOSTRAS

A maneira de retirar e a quantidade de amostra a ser tomada depende de uma série de fatores, como do tipo de amostra, tamanho do lote, homogeneidade do alimento, sua variação normal e a sensibilidade do método analítico que será utilizado. No entanto, alguns aspectos são fundamentais, tais como:

A amostra deve ser representativa do lote, estoque ou partida.

A amostra deve ser obtida segundo um plano amostral pré-estabelecido; para vários tipos de alimentos são disponíveis planos de amostragem especificados pela legislação.

O tamanho da amostra deve ser suficiente para as análises que deverão ser executadas, incluindo repetições e contraprovas.

A embalagem deve assegurar que a composição não seja modificada, desde a retirada da amostra até o início da análise; preferencialmente manter a embalagem original.

Deve-se avaliar a origem da amostra, se for removida durante o processamento, de prateleiras, locais de estoque, ou se consiste apenas em algumas embalagens enviadas ao laboratório.

Deve-se levar em consideração o objetivo da análise, que é definido em função do controle de qualidade, identificação dos padrões de identidade, qualidade geral ou legislação pertinente.

Dentro do conceito de que a análise começa com a coleta da amostra, o procedimento da coleta deve estar bem integrado com o laboratório, devendo haver sincronismo entre a remessa e a capacidade do laboratório em executar as análises.

As amostras devem ser coletadas separadamente para os diferentes tipos de análises: físico-químicas, sensoriais, microbiológicas e microscópicas. Caso haja apenas uma embalagem, primeiro deve-se retirar a amostra destinada a análise microbiológica e após para as demais. Normalmente não se tem este problema, porque em um processo de inspeção e análise, retiram-se várias embalagens de cada produto.

No caso de retirada de amostras do local original (embalagem ou a granel), as amostras para análises físico-químicas deverão ser acondicionadas em recipientes limpos e íntegros (sem perfurações, rachaduras ou impurezas). Em casos especiais, a amostra poderá ser acompanhada de relatório adicional, contendo informações que possam auxiliar o analista na condução do seu trabalho.

Depois de coletadas, as amostras deverão ser acondicionadas adequadamente, para evitar qualquer alteração nas mesmas até sua chegada ao laboratório. Assim, as amostras de produtos facilmente perecíveis deverão ser acondicionadas em recipientes isotérmicos, embaladas em recipientes adequados e acompanhadas de gelo ou outra substância refrigerante, cuidando-se sempre para que não haja problemas de contaminação da amostra.

Providências especiais deverão ser tomadas para que o tempo decorrido entre a coleta da amostra e a entrega ao laboratório seja o mais breve possível, recomendando-se que seja evitada a utilização de mecanismos que impliquem em estocagem intermediária entre o ponto de coleta e o laboratório.

Somente devem ser aceitas para análise amostras acondicionadas em embalagens lacradas, seja originalmente ou efetuada pelo técnico competente que efetuou a coleta.

De uma forma geral, para acondicionamento de amostras na forma de grão ou pó, é suficiente o emprego de saco de papel, desde que estas amostras não sejam higroscópicas. Recomenda-se o uso de vidro para produtos gordurosos, higroscópicos, oriundas de frituras e líquidos em geral. Produtos acondicionados em pacotes, latas ou garrafas, devem, preferencialmente, serem conservados no recipiente original.

1.2.2. IDENTIFICAÇÃO E INSPEÇÃO DA AMOSTRA

A inspeção da amostra consiste em realizar sua identificação, pela:

Anotação do nome do produto, marca, data de coleta, origem da amostra, peso do conteúdo e outras informações relevantes contidas na embalagem.

Avaliação visual cuidadosa da embalagem, verificando se está integra; e verificando possíveis anormalidades físicas.

É conveniente que se faça um relatório da amostra que será analisada, no momento de sua coleta ou no momento da recepção no laboratório de análise, no qual deve constar dados relativos à (s) análise (s) em questão, e quaisquer outros dados relativos ao produto (ou à amostra) tanto de identificação como de caracterização, como:

Identificação do fabricante.

Descrição da embalagem e registro do produto.

Identificação do peso (líquido e drenado) e características gerais da rotulagem.

Data de fabricação e data de validade do produto.

Tipo de amostra, nome fantasia.

Número do lote do produto.

Local, dia, hora (se necessário a temperatura) de tomada de amostra.

Número de cadastro da recepção no laboratório.

Período da análise.

Analista responsável.

Metodologia empregada na análise.

1.2.3. PREPARO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE

No laboratório, toda amostra requer um tratamento prévio antes que possa ser submetida à análise, que geralmente envolve desintegração e/ou homogeneização.

O tamanho da amostra para a análise deve ser suficiente para a realização das análises, usualmente é exigido três a cinco repetições de cada análise, além da quantidade de amostra que deve ser mantida guardada para possível contraprova.

Alguns procedimentos gerais devem ser adotados para preparar a amostra antes de se retirar a porção para a análise, tais como:

Amostras sólidas - devem ser bem desintegradas, em trituradores, moinhos ou em gral, e após realizar a remoção de diferentes porções do material.

Amostras líquidas - devem ser bem agitadas, homogeneizadas, se for necessário filtrar, e remover porções de diferentes regiões do recipiente.

Amostras líquidas gasosas - realizar uma agitação prévia para remover o gás.

Amostras açucaradas ou gordurosas, sólidas ou semissólidas - submeter a um aquecimento prévio em banho-maria, em temperaturas inferiores a 45 ^{0}C, para liquefazer o material.

Amostras com tecidos sólidos não comestíveis (ossos, caroços) - remover as partes não comestíveis e após triturar o material.

Após a coleta e preparação da amostra, deve-se tomar o cuidado de identificar adequadamente a cada amostra, e sub amostras, nos recipientes, utilizando-se canetas apropriadas ou etiquetas adequadas, evitando codificar apenas as tampas dos recipientes.

Sempre que possível, realizar as análises logo após o preparo das amostras, para se evitar erros devido perda ou absorção de umidade, perda de voláteis, ocorrência de reações enzimáticas ou químicas, ou devido a outras alterações que possam ocorrer em função do tipo específico de amostra.

Dependendo do tipo de amostra, pode-se guardar em ambientes (recipientes, refrigerador ou congelador) adequados até o momento da análise. Para determinadas amostras, pode-se preparar e congelar a amostra, de preferência a temperaturas inferiores a -18 ^{0}C, por períodos pré-determinados, antes de iniciar sua análise.

ANEXO 1

Tabela 1.1. Códigos de riscos (R) de reagentes e/ou solventes

R1	Explosivo no estado seco.
R2	Risco de explosão por choque, fricção ou outras fontes de ignição.
R3	Grande risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição.
R4	Forma compostos metálicos explosivos muito sensíveis.
R5	Perigo de explosão sob a ação do calor.
R6	Perigo de explosão com ou sem contato com ar.
R7	Pode provocar incêndio.
R8	Favorece a inflamação de materiais combustíveis.
R9	Pode explodir quando misturado com materiais combustíveis.
R10	Inflamável.
R11	Facilmente inflamável.
R12	Extremamente inflamável.
R13	Gás extremamente inflamável.
R14	Reage violentamente em contato com a água.
R15	Em contato com a água libera gases extremamente inflamáveis.
R16	Explosivo quando misturado com substâncias oxidantes.
R17	Espontaneamente inflamável ao ar.
R18	Pode formar mistura vapor-ar explosiva/inflamável durante a utilização.
R19	Pode formar peróxidos explosivos.
R20	Nocivo por inalação.
R21	Nocivo em contato com a pele.
R22	Nocivo por ingestão.
R23	Tóxico por inalação.
R24	Tóxico em contato com a pele.
R25	Tóxico por ingestão.
R26	Muito tóxico por inalação.
R27	Muito tóxico em contato com a pele.
R28	Muito tóxico por ingestão.
R29	Em contato com a água libera gases tóxicos.
R30	Pode tornar-se facilmente inflamável durante o uso.
R31	Em contato com ácidos libera gases tóxicos.
R32	Em contato com ácidos libera gases muito tóxicos.

Tabela 1.1. Códigos de riscos (R) de regentes e/ou solventes (continuação)

R33	Perigo de efeitos cumulativos.
R34	Provoca queimaduras.
R35	Provoca queimaduras graves.
R36	Irritante para os olhos.
R37	Irritante para as vias respiratórias.
R38	Irritante para a pele.
R39	Perigo de efeitos irreversíveis muito graves.
R40	Possibilidade de efeitos irreversíveis.
R41	Risco de graves lesões oculares.
R42	Pode causar sensibilidade por inalação.
R43	Pode causar sensibilidade em contato com a pele.
R44	Risco de explosão se aquecido em ambiente fechado.
R45	Pode causar câncer.
R46	Pode causar alterações genéticas hereditárias.
R47	Pode provocar efeitos teratogênicos.
R48	Risco de sérios danos à saúde por exposição prolongada.
R49	Tóxico para organismos aquáticos.
R50	Nocivo para os organismos aquáticos.
R51	Pode causar efeitos nefastos em longo prazo no ambiente aquático.
R52	Tóxico para a flora.
R53	Tóxico para a fauna.
R54	Tóxico para os organismos do solo.
R55	Tóxico para as abelhas.
R56	Pode causar efeitos nefastos em longo prazo ao ambiente.
R57	Perigo para a camada de ozônio.
R58	Pode Comprometer a fertilidade.
R59	Risco durante a gravidez com efeitos adversos na descendência.
R60	Possíveis riscos de comprometer a fertilidade.
R61	Possíveis riscos durante a gravidez de efeitos indesejáveis na descendência
R62	Pode causar danos nas crianças alimentadas com leite materno.

Tabela 1.2. Códigos de cuidados (S) para reagentes e/ou solventes.

S1	Guardar fechado à chave.
S2	Manter fora do alcance das crianças.
S3	Guardar em lugar fresco.
S4	Manter fora de qualquer zona de habitação.
S5	Manter sob líquido apropriado, especificado pelo fabricante.
S6	Manter sob gás inerte, especificado pelo fabricante.
S7	Manter o recipiente bem fechado.
S8	Manter o recipiente ao abrigo da umidade.
S9	Manter o recipiente num local bem ventilado.
S10	Manter o produto em estado úmido.
S11	Evitar o contato com o ar.
S12	Não fechar o recipiente hermeticamente.
S13	Manter afastado de alimentos.
S14	Manter afastado de substâncias incompatíveis.
S15	Manter afastado do calor.
S16	Manter afastado de fontes de ignição.
S17	Manter afastado de materiais combustíveis.
S18	Manipular o recipiente com cuidado.
S19	Não comer e não beber durante a manipulação.
S20	Evitar contato com alimentos.
S21	Não fumar durante a manipulação.
S22	Evitar respirar o pó.
S23	Evitar respirar os vapores.
S24	Evitar o contato com a pele.
S25	Evitar o contato com os olhos.
S26	Em caso de contato com os olhos, lavar com bastante água.
S27	Tirar imediatamente a roupa contaminada.
S28	Em caso de contato com a pele, proceder conforme instruções do fabricante.
S29	Não descartar resíduos na pia.
S30	Nunca verter água sobre o produto.
S31	Manter afastado de materiais explosivos.
S32	Manter afastado de ácidos e não descartar na pia.
S33	Evitar a acumulação de cargas eletrostáticas.

Tabela 1.2. Códigos de cuidados (S) para reagentes e/ou solventes (continuação)

S34	Evitar choques e fricção.
S35	Tomar cuidado com o descarte.
S36	Usar roupa de proteção durante a manipulação.
S37	Usar luvas e proteção apropriadas.
S38	Usar equipamentos de respiração adequados.
S39	Proteger os olhos e rosto.
S40	Limpar corretamente o piso e objetos contaminados.
S41	Em caso de incêndio ou explosão, não respirar os fumos.
S42	Usar equipamentos de respiração adequados (fumigações).
S43	Usar o extintor correto, em caso de incêndio.
S44	Em caso de mal-estar procurar um médico.
S45	Em caso de acidente, procurar um médico.
S46	Em caso de ingestão, procurar um médico, levando o rótulo do frasco.
S47	Não ultrapassar a temperatura especificada.
S48	Manter úmido com o produto especificado pelo fabricante.
S49	Não passar para outro frasco.
S50	Não misturar com produtos especificados pelo fabricante.
S51	Usar em áreas ventiladas.
S52	Não recomendável para uso interior.

CAPÍTULO

02 Aspectos relacionados aos métodos e erros de análises

2.1. ESCOLHA DO MÉTODO ANALÍTICO

Vários métodos podem ser utilizados na análise qualitativa e quantitativa de alimentos, incluindo os físicos, químicos e físico-químicos. Antes de escolher um determinado método analítico deve-se considerar vários fatores. O método ideal deve possuir todos os atributos essenciais, como exatidão, precisão, especificidade, sensibilidade, ser prático, rápido e econômico. Dentre os termos mencionados, salienta-se:

Especificidade - está relacionada com a capacidade do método analítico em medir o composto de interesse, independente da presença de substâncias interferentes. Quando o método for específico, o interferente não será computado com o composto de interesse, ou ele poderá ser descontado.

Sensibilidade - consiste na relação entre a capacidade do sinal medido e a propriedade a ser medida. A sensibilidade pode ser medida no método e com o equipamento a ser utilizado na análise.

Limite de detecção - consiste na menor quantidade ou concentração de um dado componente que pode ser detectado pelo método, com uma probabilidade conhecida.

Como se pode observar, não é possível otimizar todas estas condições em só método, por isto, deve-se decidir a escolha de um método em função do objetivo da análise, ou seja, de quais os atributos que devem ser priorizados. Em termos gerais os métodos de análise podem ser classificados em:

Métodos oficiais - são os métodos testados e aprovados por laboratórios competentes, que deveriam ser seguidos pela legislação ou por agências oficiais de fiscalização.

Métodos padrões ou de referência - são métodos desenvolvidos e testados por um conjunto de laboratórios através de estudos colaborativos.

Métodos modificados - são os métodos que passam por alguma modificação, normalmente a partir de um método oficial ou padrão, no sentido de impor uma simplificação, ou adaptá-lo segundo as condições existentes. Dentro destes métodos, normalmente se incluem os métodos de rotina.

Métodos rápidos - são métodos que reduzem o tempo de análise normalmente utilizado, mas como regra geral apresenta menor exatidão na medida em relação ao método oficial. São muito úteis em análises na determinação aproximada de umidade, teor de proteínas e teor de gorduras em alimentos.

2.2. MÉTODOS OFICIAIS DE ANÁLISE DE ALIMENTOS

Atualmente tem disponível uma série de metodologias de análises de alimentos apresentados na literatura. No entanto, para análises oficiais, como para a expedição de laudos técnicos, deve-se empregar uma metodologia oficial ou especificada pelo órgão competente.

Os métodos oficiais aceitos internacionalmente são cuidadosamente desenvolvidos e padronizados em todo o globo terrestre, e quaisquer laboratórios que utilizem destes métodos, deveriam apresentar resultados similares para um determinado procedimento.

Além da metodologia oficial, os laboratórios credenciados pelos órgãos competentes devem passar por um processo de inspeção periódica quanto a calibração de equipamentos e vidrarias, e nível de treinamento de seus laboratoristas.

Dentre os métodos oficiais destacam-se:

AOAC (*Official Analytical Chemists International*) - consiste no mais conhecido e um dos mais completos *Compendium* de análise de alimentos, o qual contém praticamente todo o tipo de análises que se deseja realizar com um determinado alimento.

AACC (*American Association of Cereal Chemists*) - consiste no *Compendium* específico de análise de cereais e seus subprodutos.

AOCS (*American Oil Chemists' Society*) - consiste no *Compendium* específico de análise de óleos, gorduras e seus subprodutos.

Standard Methods for the Examination of Dairy Products - consiste no *Compendium* específico de análise de leite e seus subprodutos.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - consiste no *Compendium* específico de análise de água e resíduos aquosos.

Além destes métodos internacionais, vários outros têm sido adotados como oficiais em alguns países, devido ao custo e dificuldade em executar alguns destes métodos internacionais. No Brasil tem-se adotado metodologias do Instituto Adolfo Lutz (alimentos em geral), LANARA (alimentos de origem animal), além de metodologias específicas descritas em *Compendium*, Resoluções e Instruções Normativas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Ministério da Saúde e da ANVISA.

2.3. ERROS RELACIONADOS ÀS ANÁLISES

2.3.1. ERROS EM MEDIDAS

Medida exata - está relacionada ao seu erro absoluto, ou seja, com a proximidade do valor medido em relação ao valor verdadeiro da grandeza.

Medida precisa - está relacionada com a concordância das medidas entre si, ou seja, quanto menor a dispersão dos valores, maior a precisão; portanto, está relacionado com a reprodutibilidade das medidas. No entanto, medidas precisas podem não serem exatas, devido a fatores como de erro humano, de equipamento ou erro de método.

Erro absoluto - é definido como a diferença absoluta entre o valor medido (V_m) e o valor verdadeiro (V_V) de uma dada grandeza (**Erro absoluto = V_m - V_V**).

Erro relativo - normalmente o erro de uma análise é expresso em termos relativos, ou seja, o erro absoluto em relação ao valor verdadeiro, os quais podem ser expressos em partes por cem [**(Erro absoluto / Valor verdadeiro) x 100**], ou em partes por 1000 [**(Erro absoluto / valor verdadeiro) x 1000**].

Desvio da média - é utilizado quando se tem uma série finita de medidas, sendo expresso pela somatória de cada valor subtraído da média dos valores e dividido pelo número de valores (n) **[D= ∑ (valor- média dos valores) / n**)].

2.3.2. TIPOS DE ERROS EM UMA ANÁLISE

2.3.2.1. ERROS DETERMINADOS

Erros de método - quando se realiza uma análise costuma-se seguir ou adaptar um procedimento ou método retirado da literatura. Entretanto, a realização de análises segundo um determinado método pode induzir a erros, inerentes ao próprio método, não importando o cuidado que se tenha no trabalho. Os erros inerentes a um método são difíceis de serem detectados.

Erros operacionais - são erros relacionados com as manipulações feitas durante a realização das análises e, dependem somente da capacidade técnica do analista.

Erros devidos a instrumentos e reagentes - são erros relacionados com as imperfeições dos instrumentos e aparelhos volumétricos (descalibrados) e da impureza dos reagentes.

2.3.2.2. ERROS INDETERMINADOS

Mesmo na ausência de erros determinados (sistemáticos), se um mesmo operador executa uma mesma análise, haverá pequenas variações nos resultados. Isto é consequência dos erros indeterminados (aleatórios), os quais não podem ser localizados e corrigidos.

2.3.3. ERROS DE EXPRESSÃO DE RESULTADOS

O erro de expressão de resultados está relacionado ao erro vinculado ao número de algarismos significativos, o qual aparece quando é necessário expressar o valor de uma dada grandeza determinada experimentalmente. Este valor pode ser obtido diretamente (como na pesagem, determinação de um volume), ou indiretamente (onde envolve cálculos).

Algarismos significativos de um número estão relacionados aos dígitos que representam um resultado experimental, de modo que apenas o último algarismo seja duvidoso, portanto, o número de algarismos significativos expressa a precisão de uma medida.

O número de algarismos significativos não depende do número de casas decimais, por exemplo: 0,002060; 0,2060; 2,060; 20,60; 206,0; 2060, todos possuem 4 algarismos significativos. O algarismo zero é apenas significativo quando se encontra no meio ou no final de um número, quando está associado a uma determinada medida. Quando o zero se apresenta a frente do número, apenas indica a ordem da grandeza. No caso dos números

representados em potência de 10, como a notação científica, todos os algarismos são significativos, com exceção da potência.

Exemplo

$0,003450 = 34,50 \times 10^{-4}$ ⇨ possui 4 algarismos significativos.

$0,000003450 = 3,450 \times 10^{-6}$ ⇨ possui 4 algarismos significativos.

$142,7 = 1,427 \times 10^{2}$ ⇨ possui 4 algarismos significativos.

$1,4270 \times 10^{2}$ ⇨ possui 5 algarismos significativos.

Todas as medidas físicas possuem um determinado grau de incerteza. Quando se expressa uma medida procura-se manter esta incerteza em níveis baixos e toleráveis, de modo que o resultado possua uma confiabilidade aceitável, sem a qual a informação obtida não terá valor.

Por exemplo, a medida em uma balança de 0,154 g, poderia ser lido como 0,153 g ou 0,155 g (dependendo da escala, operador e aparelho), assim poderia ser expresso como 0,154 g ± 0,001. O último algarismo está associado a uma incerteza na medida; e, portanto, da precisão da medida em ± 0,001.

Outro exemplo, se ocorre a pesagem de um material de peso 12,3413 g em uma balança analítica (± 0,0001 - grau de incerteza da balança é na quarta casa), o valor é expresso como 12,3413 g. No entanto, se pesar o mesmo corpo em balança semi-analítica (± 0,01 - grau de incerteza é na segunda casa), o valor é expresso como 12,34 g ± 0,01.

Assim, quando se efetua operações com diferentes números de algarismos significativos, devem-se seguir determinadas regras para se obter um resultado adequado em função do grau de incerteza. Nas operações de multiplicação e divisão, considera-se o resultado final com o mesmo número de dígitos contidos no número com menos algarismos significativos. Na adição e subtração, considera-se o menor número de casas depois da vírgula, sempre arredondando na última casa.

Exemplo

108,9984 + 83,80 = 192,80 (2 casas depois a vírgula)

90,2345 - 8,324 = 81,911 (3 casas depois da vírgula)

$3,26.10^{-5} \times 1,78 = 5,80 \times 10^{-5}$ (3 algarismos significativos)

34,6 / 2,4628 = 14,1 (3 algarismos significativos)

Alguns fatores são importantes para que se possa obter resultados confiáveis, além da correta expressão dos valores. A fim de verificar a repetibilidade dos resultados, a análise de uma determinada amostra deve ser executada pelo menos três vezes, usando três alíquotas diferenciadas. O resultado final da análise será a média aritmética dos resultados parciais válidos, isto é, dos resultados individuais obtidos nas diversas análises. No entanto, se uma das repetições apresentar um valor muito diferenciado das outras medidas da análise, deve-se descartar este valor e repetir a análise, para que haja uma coerência (precisão) dos resultados.

CAPÍTULO

03 Tópicos em conversão de unidades e preparo de soluções

3.1. SISTEMA BÁSICO DE UNIDADES

Na engenharia, ciência e tecnologia de alimentos, existem vários sistemas de unidades que são empregados. No entanto, no intuito de unificar as expressões de peso, volume, área e demais grandezas, foi criado o Sistema Internacional de Unidades (SI). Mesmo embora este seja o sistema mais utilizado, outros sistemas ainda são empregados em alguns países, principalmente o sistema inglês *(English system*).

Muitos prefixos do SI (tabela 3.1) são normalmente empregados em várias aplicações, tanto na expressão de concentrações quanto em aplicações usuais na área de alimentos.

TABELA 3.1. Prefixos do Sistema Internacional de Unidades, em comparação com o grama.

Prefixo Unidade	Prefixo Unidade	Prefixo Unidade	Prefixo Unidade
yotta (Y)= 10^{24}	giga (G)= 10^{9}	grama (g)= 10^{o}	nano (n)= 10^{-9}
zetta (Z)= 10^{21}	mega (M)= 10^{6}	deci (d)= 10^{-1}	pico (p)= 10^{-12}
exa (E)= 10^{18}	quilo (k)= 10^{3}	centi (c)= 10^{-2}	femto= 10^{-15}
gpeta (P)= 10^{15}	hecto (h)= 10^{2}	mili (m)= 10^{-3}	Atto= 10^{-18}
tera (T)= 10^{12}	deca (da)= 10^{1}	micro (μ)= 10^{-6}	zepto= 10^{-21}

Em aplicações laboratoriais, é muito comum converter expressões de massa e de volume, para expressar os resultados obtidos em uma análise. Algumas das principais relações, envolvendo massa, volume, mol e equivalente grama (eqg), em relação ao grama e suas unidades correspondentes, estão expressas na Tabela 3.2.

TABELA 3.2. Relações de massa, volume, mol e equivalente grama

kg(10^3)*	hg(10^2)	dag(10^1)	g(10^0)	dcg(10^{-1})	cg(10^{-2})	mg(10^{-3})	µg(10^{-6})
kL	hL	daL	L	dL	cL	mL	µL
km^3	hm^3	dam^3	m^3	dm^3	cm^3	mm^3	μm^3
kmol	hmol	damol	mol	dmol	cmol	mmol	µmol
keqg	heqg	daeqg	eqg	deqg	ceqg	meqg	µeqg

*(10^x) = em relação ao grama; eqg = equivalente grama.

Assim, quando se converte um valor do grama (g) para uma unidade menor, multiplica-se o valor pela potência de 10 (multiplica-se pela potência positiva), equivalente ao número de unidades envolvidas. Por outro lado, no caso inverso, quando se converte um valor do grama (g) para uma unidade maior, divide-se o valor pela potência de 10 (multiplica pela potência negativa), equivalente ao número de unidades envolvidas.

Exemplos

a) Ao converter 0,25 L para mL, tem-se: 0,25 x 10^3 = 250 mL.

b) Ao converter 0,02 mol para milimol (mmol), tem-se: 0,02 x 10^3 = 20 mmol.

c) Ao converter 5000 µeqg para eqg, tem-se: 5000 x 10^{-6} = 0,005 eqg.

d) Ao converter 10 mL em cm^3, tem-se:

Na conversão de valores entre escalas deve-se utilizar de unidade equivalentes entre as escalas, e neste caso se utiliza a relação de 1 L = 1 dm^3 (Tabela 3.3)

Assim, primeiro se converte mL para L: 10 mL = 10 x 10^{-3} L. Sabendo que 1 L = 1 dm^3, então 10 x 10^{-3} L = 10 x 10^{-3} dm^3. E finalmente convertendo para cm^3, se tem: 10 x 10^{-3} dm^3 x 10^3 = 10 cm^3. Portanto, 10 mL = 10 cm^3.

Também é comum na expressão de resultados de uma análise, expressar os resultados fazendo conversões múltiplas, como do exemplo:

e) Converter 2 mg / cm^3 em g / L:

Inicialmente se converte 2 mg para g: 2 mg x 10^{-3} = 2 x 10^{-3} g

Após se faz a conversão de cm^3 para L: 1 cm^3 x 10^{-3} = 1 x 10^{-3} dm^3. Como 1 L = 1 dm^3, então 1 x 10^{-3} dm^3 = 1 x 10^{-3} L

Portanto, reescrevendo: 2 x 10^{-3} g / 1 x 10^{-3} L; e expressando a relação por 1 L, tem-se:

2 x 10^{-3} g ------- 1 x 10^{-3} L

x g -------- 1 L, assim se tem: x = 2 g / L.

TABELA 3.3. Fatores de conversões comuns na análise de alimentos

Expressões	Unidade	Equivalência no S.I.
Volume	1 L	1 dm^3 = 3,531 x 10^{-2} ft^3 = 61,02 in^3
	1mol	22,414 L
Comprimento	1 m	39,37 in = 3,221 ft = 6,214 x 10^{-4} mi
	1 A^0	10^{-10}m
	1 in	2,54 cm
Massa	1 lb	453,59g = 16 oz
	1 ton	2240 lb = 1000 kg
Força	1 N	10^5 dyn = 0,2248 lb = 102 gf
Pressão	1 atm	760 mmHg = 1,013x10^5 Pa = 14,7 psi
	1 kgf	9,807x10^5 dyn
	1 bar	10^6 dyn.cm^{-2} = 10^5N.m^{-2} = 10^5 Pa
Potência	1 hp	0,7457 kw
	1 W	1 J.s^{-1} = 14,34 cal.m^{-1}
Energia	1 J	1 kg.m^2.s^{-2} = 1 N.m = 9,481x10^{-4} btu = 10^7 erg
	1 cal	4,1840 J
	1 Cal	1.000 cal
Temperatura	1 ^{0}C	K – 273,15 = (F - 32) / 1,8
	1 ^{0}F	1,8 (K – 273,15) + 32

ft = pé; in = polegada; mi = milha; oz = onça; ton = tonelada; A^o = angstron; dyn = dina; Pa = Pascal; J = Joule; lb= libra; gf = grama força; N = Newton.

3.2. PRINCIPAIS EXPRESSÕES DE CONCENTRAÇÃO DE SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ANÁLISE DE ALIMENTOS

3.2.1. SÍNTESE DE ALGUNS CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Átomo

É definido classicamente como a menor parte de um elemento que pode existir em uma troca química. Os átomos de um dado elemento possuem um número atômico (Z= n^o prótons) característico, o qual é utilizado para diferenciar um elemento de outro. O mesmo elemento químico possui o mesmo número de prótons, mas pode possuir massas atômicas diferentes (devido a diferença no número de nêutrons), os quais são denominados de isótopos. A massa atômica de isótopos é calculada pela média ponderada da massa de seus isótopos.

Moléculas

As moléculas são formadas por associações de átomos de um mesmo elemento ou de diferentes elementos químicos. O peso molecular é calculado pela soma dos pesos atômicos dos respectivos átomos. Os pesos atômicos e moleculares são quocientes adimensionais que não tem relação com qualquer unidade particular de medida. Quando se usa a unidade de massa grama do sistema métrico, tem-se a molécula grama. Como a massa de um único átomo é extremamente pequeno, o número de átomos em um átomo grama de qualquer elemento é muito grande. Um átomo grama de qualquer elemento contém um número de átomos igual ao número de Avogadro (N = 6.023 x 10^{23}).

Mol

O mol de uma substância pura é definido como a quantidade da substância igual ao seu peso molecular (soma das massas atômicas). As unidades do mol ou molécula grama são muito úteis para o cálculo de concentração de soluções e na estequiometria de reações químicas. Um (01) mol de moléculas equivale a 6.023×10^{23} moléculas, e da mesma forma, um mol de átomos equivale a 6.023×10^{23} átomos.

Equivalente grama

Consiste nas massas que se equivalem em uma reação química. Assim, para substâncias não oxidantes e não redutoras, o equivalente grama consiste na relação entre a massa molecular e o número total de oxidação dos radicais que reagem (ex.: para ácidos consiste no número total de oxidação de H^+ que reagem; para as bases no número de OH^-; e para os óxidos e sais no número total de oxidação do cátion ou do ânion que reage). Para substâncias oxidantes ou redutoras, o equivalente grama consiste na relação entre a massa molecular e a variação total do número de oxidação por fórmula. Pelo equivalente grama (eqg) das substâncias pode-se calcular a proporção de combinação entre os reagentes e a formação dos produtos em uma reação química, pois a proporção de combinação entre os reagentes e a formação dos produtos ocorrem de forma equivalente, ou seja, na mesma proporção entre equivalentes gramas.

Densidade (ρ)

A densidade representa a quantidade de massa por unidade de volume de uma substância. Um termo associado a densidade é a gravidade específica, que representa a densidade de um fluido em relação a densidade da água. Se a densidade for medida a 4 ^{0}C ($\rho H_2O = 1,00$), a gravidade específica será numericamente igual a sua densidade.

Saturação de uma solução

Consiste na concentração máxima de um soluto em um determinado solvente a uma temperatura definida. Na prática, se visualiza o ponto de saturação de uma solução quando começa a se depositar o soluto, sem que haja mais a sua dissolução.

As aplicações destes conceitos são muito úteis na análise de alimentos. Como exemplo, se tivermos em um béquer 35 g de $CaCl_2$ (Ca = 40,1; Cl = 35,5) dissolvidos em 500 mL de solução, se tem:

a) quantos gramas de soluto por mL de solução?

35 g soluto ---- 500 mL solução

x g ---- 1 mL solução; assim x= 0,07 g soluto / mL solução.

b) quantos moles de soluto na solução?

1 mol soluto ------ 111,1 g [(40,1 x 1) + (35,5 x 2)]

x mol ------ 35 g; assim x = 0,32 mol soluto / 500 mL solução.

c) quantos equivalentes gramas de soluto na solução?

Eqg = mol / 2 = 111,1 / 2 = 55,55 g

Então, 1 eqg ------ 55,55 g

x eqg ------ 35 g, assim x = 0,63 eqg soluto / 500 mL solução.

Ao retirar 10 mL desta solução e transferir para um balão volumétrico de 200 mL e completar o volume com água, se tem:

d) quantas gramas de soluto nos 10 mL da solução?

35 g soluto ---- 500 mL solução

x g ---- 10 mL solução, assim x = 0,7 g soluto / 10 mL solução.

e) quantos gramas de soluto nos 200 mL desta solução?

Tem 0,7 g de soluto nos 10 mL de solução que foram removidos, e após adicionou-se apenas água até completar o volume de 200 mL, assim, permanecem 0,7 g de soluto nos 200 mL de solução.

f) quantas gramas soluto / mL de solução?

0,7 g soluto ----- 200 mL solução

x g ----- 1 mL solução, assim x = 0,0035 g soluto / mL solução.

g) quantos moles de soluto na solução?

Nos 200 mL de solução tem 0,7 g de soluto, assim:

1 mol ------ 111,1 g

x mol ------ 0,7 g, assim x = 0,0063 moles soluto / 200 mL solução.

h) quantos equivalentes gramas de soluto na solução?

1 eqg soluto ---- 55,5 g

x eqg ---- 0,7 g, assim x = 0,013 eqg soluto / 200 mL solução.

3.2.2. EXPRESSÕES DE CONCENTRAÇÕES

Expressões de proporções x+y ou x:y

Estas expressões são utilizadas na indicação que o primeiro valor (x) refere-se ao volume ou massa do reagente (soluto) utilizado, e o segundo valor (y) ao volume ou massa de solvente ou do segundo reagente utilizado na preparação.

Assim, uma solução de ácido clorídrico 1+1 (v/v) ou 1:1 (v/v), significa que 1 volume de solução de ácido clorídrico foi misturado (diluído) com 1 volume de água.

Exemplos

a) Ao adicionar-se solução de ácido clorídrico 0,1 N em água, em um total de 250 mL de solução, na proporção de 2+3 (v/v) ou 2:3 (v/v), tem-se:

250 mL do total da solução ----- equivalem a 5 partes (2+3)

x mL ----- 1 parte; assim x = 50 mL

Assim, 1 parte corresponde a 50 mL; portanto, nos 250 mL de solução final, tem-se 100 mL de solução de ácido clorídrico (2 partes) e 150 mL de água (3 partes).

b) Ao preparar 500 mL de solução de HNO_3 1:4 (v/v), se tem:

Total de partes = 5, assim 500 / 5=100 mL

Portanto, 1 x 100 mL de solução de ácido nítrico são misturados com 400 mL (4 x 100 mL) de água, totalizando os 500 mL de solução.

Porcentagem

A porcentagem expressa a quantidade relativa de um soluto em cem partes da solução. Assim, uma solução a 1% significa que se tem 1 parte de soluto em 100 partes da solução. No entanto, as partes do soluto e da solução podem estar ambas no estado sólido, líquido ou gasoso, ou o soluto e a solução estarem em estados físicos diferentes. Assim é importante a especificação das unidades das partes, tanto do soluto quanto da solução. Portanto, a expressão de uma solução sob a forma de porcentagem pode estar em uma das quatro formas:

Porcentagem (m/m) - compreendida como gramas da substância (soluto) contidas em 100 g da solução (pouco utilizada na preparação de soluções, mas é muito utilizada em expressões de componentes presentes em amostras).

Porcentagem (m/v) - expressa gramas da substância (soluto) em 100 mL da solução.

Porcentagem (v/v) - expressa volume da substância (soluto líquido) em 100 mL da solução.

Porcentagem (v/m) - expressa volume da substância (soluto líquido) em 100 g da solução (raramente usada em soluções).

Portanto, as expressões de porcentagem utilizadas na análise de alimentos são m/v, v/v, v/m e m/m.

Exemplo

Ao colocar 10 g de cloreto de sódio (supondo que esta solução apresenta densidade de 1,080 $g.mL^{-1}$) e completar o volume a 250 mL com água, se tem:

a) % m/v

Por definição, % m/v é a quantidade em g de NaCl presentes em 100 mL de solução.

Assim, se tem: 10 g de NaCl ---- 250 mL solução

x g ---- 100 mL solução, assim x = 4% (m/v).

b) % m/m

Por definição, % m/m é a quantidade em g NaCl presentes em 100 g solução.

Então, primeiro calcula-se a massa que corresponde os 250 mL de solução, a qual apresenta densidade de 1,080 $g.mL^{-1}$.

Pela definição da densidade (ρ), 1,080 $g.mL^{-1}$ significa que 1 mL da solução pesa 1,080 g.

Assim, 1,080 g solução ----- 1 mL solução

x g ----- 250 mL, assim, x = 270 g.

Portanto, 250 mL de solução pesam 270 g, então:

10 g NaCl ----- 270 g solução

x g ----- 100 g, x = 3,7% (m/m).

Da mesma forma, utilizando dos mesmos princípios, pode-se preparar soluções % m/v ou % m/m.

Exemplo

Para preparar 500 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 4% (sabendo que a densidade final ficaria em 1,0623 $g.mL^{-1}$), precisaria de quantas gramas da base, se o percentual for:

a) % m/v?

4% m/v significa que deve ter: 4 g de KOH --- 100 mL solução, então:

x g ---- 500 mL, assim deve se colocar 20 g de KOH / 500 mL solução para corresponder a 4% m/v.

b) % m/m?

4 % m/m significa que deve ter: 4 g de KOH ---- 100 g solução

Pela densidade calcula-se o peso de 500 mL desta solução

1,0623 g solução ----- 1 mL solução

x g ----- 500 mL, assim x= 531,15 g é o peso dos 500 mL de solução

Portanto, 4 g soluto ---- 100 g solução

x g ---- 531,15 g, assim se deve colocar 21,25 g KOH em 500 mL de solução para corresponder a 4% m/m.

Se utiliza muito o % para preparar diluições de soluções líquidas

a) Preparar 200 mL de solução de HCl a 10% (v/v)

Solução a 10% significa que se deve ter 10 mL de solução de ácido a cada 100 mL de solução, então precisa-se medir 20 mL de solução de HCl concentrada e diluir com água até atingir o volume de 200 mL.

b) Preparar 50 mL de solução de H_2SO_4 a 2% (v/v)

Solução a 2% significa que se deve ter 2 mL de solução de ácido a cada 100 mL de solução, então precisa-se medir 1 mL de solução de H_2SO_4 concentrada e diluir com água até atingir o volume de 50 mL.

c) Preparar 250 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 2% (m/v)

Solução 2% m/v, significa que deve ter 2 g de ácido a cada 100 mL de solução, em 250 mL de solução deve ter 5 g (2 g x 250 mL / 100 mL) de ácido sulfúrico. A solução de ácido sulfúrico concentrada possui a densidade de 1,840 g / mL, e a concentração de 97%. Portanto, 1 mL de solução pesa 1,840 g, e destes 1,840 g de solução, 1,7848 g (1,840 g x 97% / 100%) são de ácido sulfúrico. Então, em 1 mL de solução tem 1,7848 g de ácido, como precisa de 5 g de ácido, deve ser utilizado 2,80 mL (5 g x 1 mL / 1,7848 g) da solução de ácido concentrada, e diluída para os 250 mL com água, para corresponder a 2% m/v.

d) Preparar 500 mL de solução alcóolica a 70% (v/v) a partir de álcool 97% (v/v) ou 97 ^{0}GL

Solução de álcool a 70% (v/v) deve conter 70 mL de álcool a cada 100 mL de solução, assim, nos 500 mL de solução deve ter 350 mL (70 mL x 500 mL / 100 mL) de álcool. Na solução 97% têm 97 mL de álcool a cada 100 mL de solução, então deveria ser retirado 360,82 mL (350 mL x 100 mL / 97 mL) da solução a 97% e completado o volume a 500 mL com água.

Partes por milhão (ppm) e partes por bilhão (ppb)

Estas relações expressam partes em 1 milhão de partes (ppm) e partes em 1 bilhão de partes (ppb), e são muito úteis quando as quantidades das substâncias presentes são muito pequenas, evitando-se assim o uso de números extremamente pequenos. As unidades do soluto e solvente devem ser iguais; no entanto, como são soluções extremamente diluídas, normalmente a densidade vai ser muito próximo a 1,0, ou seja, a massa da solução corresponde praticamente ao volume da solução.

Exemplificando

Se em 2,5 L de solução conter 0,001 mL de álcool, a concentração de álcool seria:

a) Em ppm

Por definição, ppm corresponde a partes em 1 milhão de partes, assim:

0,001 mL de álcool ---- 2500 mL (2,5 L) solução

x mL álcool ----- 1000000 mL solução, assim x = 0,4 mL álcool

Portanto, tem 0,4 mL de álcool em $1x10^6$ mL solução, que corresponde a 0,4 ppm.

b) Em ppb

Por definição, ppb corresponde a partes em 1 bilhão de partes, assim:

0,001 mL de álcool ---- 2500 mL (2,5 L) solução

x mL álcool ---- 1000000000 mL solução, assim x = 400 mL de álcool

Portanto, se tem 400 mL de álcool em $1x10^9$ mL de solução, o que corresponde a 400 ppb.

Da mesma forma se utiliza destes princípios no preparo das soluções, por exemplo:

a) Para preparar 5 L de uma solução de bissulfito de sódio a 500 ppm, dever-se-ia pesar quantas gramas deste sal?

Por definição: 500 ppm equivale a 500 g bissulfito -----1000000 g ou mL de solução

x g ----- 5000 mL (5L), assim se coloca 2,5 g do sal nos 5 L solução.

b) E ao preparar a mesma solução em ppb?

Por definição, 500 ppb equivale a 500 g sal ----1000000000 g ou mL da solução

x g ---- 5000 mL, assim se coloca 0,0025 g do sal em 5 L solução.

Molaridade (M)

A unidade molar (M) é definida como a quantidade de **moles de uma substância (soluto) presente em 1 L (1000 mL) de solução**. Portanto, uma solução 1 M contém 1 mol de uma substância em 1 L de solução. Assim, sabendo-se a massa do soluto na solução, pode-se facilmente encontrar a molaridade da solução.

Exemplo

Se em 500 mL de solução conter 10 g de hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$), a molaridade corresponde a:

Por definição, solução 1 M tem 1 mol de $Ca(OH)_2$ em 1000 mL solução, então:

1 M ---- 1 mol $Ca(OH)_2$ ---- 1000 mL solução

1 M ---- x mol $Ca(OH)_2$ ---- 500 mL solução, assim x = 0,5 mol / 500 mL de solução

Assim, calcula-se quantos moles de $Ca(OH)_2$ correspondem os 10 g

1 mol $Ca(OH)_2$ ---- 74,1 g

x mol ---- 10 g, x= 0,135 mol

Então: 1 M ---- 0,5 mol de $Ca(OH)_2$ ---- 500 mL solução

x M ---- 0,135 mol de $Ca(OH)_2$ ---- 500 mL solução, assim x= 0,27 M

Normalidade (N)

A normalidade (N) diferencia-se da molaridade, por expressar a **quantidade (número) de equivalentes gramas presentes em 1 L (1000 mL) de solução**.

Assim, no mesmo exemplo anterior, 10 g de $Ca(OH)_2$ em 500 mL de solução, ter-se-ia:

Por definição, solução 1 N tem 1 eqg de $Ca(OH)_2$ em 1000 mL solução, portanto:

1 N ---- 1 eqg de $Ca(OH)_2$ ----- 1000 mL solução

1 N ---- x eqg de $Ca(OH)_2$ ----- 500 mL solução; assim x = 0,5 eqg de Ca(OH)2

Então, calcula-se quantos equivalentes gramas de $Ca(OH)_2$ correspondem os 10g

mol $Ca(OH)_2$ = 74,1 g; portanto eqg= mol / 2, assim, 1 eqg $Ca(OH)_2$ = 37,05 g

Então, 1 eqg $Ca(OH)_2$ ---- 37,05 g

x eqg $Ca(OH)_2$ ---- 10 g, assim x = 0,27 eqg

Assim: 1 N ---- 0,5 eqg de $Ca(OH)_2$ ---- 500 mL solução

x N ---- 0,27 eqg ----- 500 mL solução, assim x = 0,54 N

Portanto, 10 g de $Ca(OH)_2$ em 500 mL de solução corresponde a 0,54 N. Assim, percebe-se que o valor da Normalidade sempre será igual ou múltiplo da Molaridade.

3.2.3. PREPARO DE SOLUÇÕES MOLAR (M) E NORMAL (N)

As soluções são preparadas adicionando-se uma determinada substância de alto grau de pureza (soluto) em um recipiente adequado (balão volumétrico), completando-se o volume com o solvente. No uso comum em análise de alimentos, a água é o solvente mais comum, mas vários álcoois (como etanol, metanol e isopropanol) são frequentemente utilizados. Quando não se especifica o solvente, sempre se considera como sendo a água, por ser considerada um solvente universal. Comumente utilizam-se três processos básicos de preparação de soluções em laboratório.

A partir de substâncias sólidas

Pesa-se a quantidade desejada de sólido (soluto), dissolve-se em um béquer com uma parte do solvente, após se transfere para o balão volumétrico de volume desejado, e completa-se o volume do balão volumétrico com o solvente. As substâncias químicas utilizadas devem possuir um grau de pureza suficiente para serem empregadas como reagentes. A pesagem da substância química deve ser realizada em balança analítica de precisão observando até a quarta casa decimal.

Exemplos

Para preparar 500 mL de solução de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 0,15 M e outra 0,15 N.

a) 500 mL de solução de $MgCl_2$ 0,15 M

Mol do $MgCl_2$ = 93,21 g

Por definição, 0,15 M tem 0,15 mol $MgCl_2$ em 1000 mL solução

Assim, 1 mol $MgCl_2$ ----- 93,21 g

0,15 mol ----- x g, assim x = 13,98 g

Portanto, 0,15 M ---- 13,98 g $MgCl_2$ ----- 1000 mL solução

x g ----- 500 mL solução, assim x = 6,9900 g

Então, pesa-se 6,9900 g de $MgCl_2$, dissolve-se em béquer com água e transfere-se para balão volumétrico de 500 mL, e completa-se o volume de 500 mL com água.

b) 500 mL de solução de $MgCl_2$ 0,15 N

Mol do $MgCl_2$ = 93,21 g; assim o eqg = 93,21 / 2 = 46,61 g; portanto:

Por definição, 0,15 N tem 0,15 eqg $MgCl_2$ em 1000 mL solução

Assim, 1 eqg do $MgCl_2$ ----- 46,61 g

0,15 eqg ----- x g, assim x = 6,99 g

Portanto, 0,15 N ---- 6,99 g $MgCl_2$ ----- 1000 mL solução

x g ----- 500 mL solução, assim x = 3,4950 g

Então, pesa-se 3,4950 g de $MgCl_2$, dissolve-se em béquer com água e transfere-se para balão volumétrico de 500 mL, e completa-se o volume de 500 mL com água.

A partir de soluções concentradas

Este procedimento tem grande aplicação para a preparação de soluções a partir de soluções concentradas, nas quais não se conhece a molaridade correta, mas que se tem a concentração do soluto (%) e a densidade (ρ) da solução (tabela 3.4). É muito aplicada para o preparo de soluções a partir de ácidos ou bases concentrados.

TABELA 3.4. Concentração comercial e densidade de alguns ácidos e bases.

Substância	**Peso molecular**	% (m/m)	**Densidade ($g.mL^{-1}$)**	**Molaridade aproximada**
Ácido acético	60,1	98	1,055	17,0
Ácido clorídrico (muriático)	36,5	37	1,180	12,0
Ácido fosfórico	98,0	85	1,700	14,7
Ácido nítrico	63,0	70	1,420	15,6
Ácido perclórico	100,5	70	1,675	11,6
Ácido sulfúrico	98,1	97	1,840	17,8
Hidróxido de amônio	35,1	29	0,900	7,5

Exemplos

Preparar 500 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 M e outra 0,1 N, a partir de solução concentrada de ácido sulfúrico (concentração 97%, ρ = 1,840 $g.mL^{-1}$).

a) 500 mL de solução de H_2SO_4 0,1 M

Inicialmente se calcula quantos moles de ácido devem estar contidos nos 500 mL de solução de ácido sulfúrico que será preparada a 0,1 M.

0,1 M ---- 0,1 mol de H_2SO_4 ---- 1000 ML solução

0,1 M ---- x mol H_2SO_4 ---- 500 mL solução, assim precisa ter 0,05 mol H_2SO_4 / 500 mL solução

Como 1 mol do ácido = 98 g, 0,05 mol = 4,9 g [(0,05 mol x 98 g) / 1 mol)]

Então, nos 500 mL de solução de H_2SO_4 0,1 M precisa-se de 0,05 mol ou 4,9 g de H_2SO_4, que devem ser retirados da solução concentrada de H_2SO_4. Portanto, precisa-se saber qual o volume da solução concentrada do ácido contém estes 0,05 moles de ácido sulfúrico ou 4,9 g de ácido.

Na solução concentrada tem-se ρ= 1,840 $g.mL^{-1}$, então 1,840 g de solução corresponde ao peso de 1 mL de solução

Nesta massa de solução deve-se calcular a massa do ácido sulfúrico, que é obtida pela concentração do ácido na solução (97%), assim:

1,840 g de solução ---- 100% da massa

x g ---- 97% da massa de ácido sulfúrico, assim x= 1,7848 g

Portanto, em 1,840 g de solução concentrada se tem 1,7848 g de ácido sulfúrico.

Como a densidade é expressa em g / mL, 1 mL de solução concentrada do ácido pesa 1,840 g, na qual tem 1,7848 g de ácido sulfúrico.

Como precisa-se de 0,05 mol ou 4,9 g de ácido na solução que se quer preparar, se tem:

1,7848 g de H_2SO_4 ---- 1 mL solução

4,9 g de H_2SO_4 ---- x mL de solução, assim x = 2,75 mL

Portanto, retira-se 2,75 mL da solução concentrada, coloca-se em balão volumétrico de 500 mL contendo cerca de 300 mL de água, mistura-se e completa-se o volume com água, para se obter a solução 0,1 M.

b) 500 mL de solução 0,1 N

Inicialmente se calcula quantos equivalentes gramas de ácido devem estar contidos nos 500 mL de solução de ácido sulfúrico a 0,1 N a ser preparada.

0,1 N ---- 0,1 eqg de H_2SO_4 ---- 1000 ML solução

0,1 N ---- x eqg H_2SO_4 ---- 500 mL solução, assim x = 0,05 eqg

Portanto, nos 500 mL de solução de H_2SO_4 0,1 N precisa-se de 0,05 eqg ou 2,45 g [(0,05 eqg x 49 g) / 1 eqg)] de H_2SO_4, que deve ser retirado da solução concentrada de H_2SO_4.

Na solução concentrada do ácido tem-se ρ= 1,840 g.mL^{-1}, então 1,840 g de solução corresponde ao peso de 1 mL de solução do ácido.

Nesta massa de solução deve-se calcular a massa do ácido sulfúrico, que é obtida pela concentração do ácido na solução (97%), assim:

1,840 g de solução ---- 100% da massa

x g ---- 97% da massa de ácido sulfúrico, assim x = 1,7848 g

Portanto, em 1,840 g de solução se tem 1,7848 g de ácido sulfúrico.

Como a densidade é expressa em g / mL, 1 mL de solução concentrada do ácido pesa 1,840 g, na qual tem 1,7848 g de ácido sulfúrico.

Como precisa-se de 0,05 eqg ou 2,45 g de ácido na solução que se quer preparar, assim:

1,7848 g de H_2SO_4 ---- 1 mL solução

2,45 g de H_2SO_4 ---- x mL de solução, assim x = 1,37 mL

Portanto, retira-se 1,37 mL da solução concentrada, coloca-se em balão volumétrico de 500 mL contendo cerca de 300 mL de água, mistura-se e completa-se o volume com água, para se obter a solução de ácido 0,1 N.

A partir de solução estoque previamente preparada

Este tipo de preparação é útil quando já existe uma solução previamente preparada, de concentração conhecida. Calcula-se a quantidade em equivalentes gramas que precisa para preparar a solução desejada, e retira-se o volume necessário da solução previamente preparada, o qual contenha a quantidade em equivalentes gramas necessárias, coloca-se em balão volumétrico, e completa-se o volume com solvente. A retirada do volume de uma solução de concentração conhecida deve ser realizada, sempre que possível, com auxílio de pepitas volumétricas de volume apropriado.

Exemplos

Se no laboratório tem uma solução preparada de hidróxido de bário [$Ba(OH)_2$] 1 N (solução estoque). A partir desta solução se deseja preparar 100 mL de solução de hidróxido de bário a 0,05 N.

Inicialmente calcula-se quantos eq.g de $Ba(OH)_2$ precisam para se preparar a solução desejada:

1 N ---- 1 eqg de $Ba(OH)_2$ ---- 1000 mL solução

0,05 N ---- x eqg $Ba(OH)_2$ ---- 1000 mL solução, assim x = 0,05 eqg de hidróxido

0,05 N ---- 0,05 eqg $Ba(OH)_2$ ---- 1000 mL solução

0,05 N ---- x eqg $Ba(OH)_2$ ---- 100 mL solução, assim x = 0,005 eqg de hidróxido que precisa estar nos 100 mL da solução desejada.

Portanto, calcula-se qual o volume correspondente na solução estoque que contenha os 0,005 eqg de hidróxido necessários para preparar a solução desejada.

1N ---- 1 eqg $Ba(OH)_2$ ---- 1000 mL solução

0,005 eqg $Ba(OH)_2$ ---- x mL solução = 5 mL solução

Então, retira-se 5 mL da solução estoque, a qual contêm 0,005 eq.g de $Ba(OH)_2$, coloca-se em balão volumétrico de 100 mL e completa-se o volume com água destilada, para se obter a solução 0,05 N desejada.

Também se pode preparar uma solução Molar a partir de uma solução Normal, e vice-versa, como a seguir:

Tendo no laboratório esta solução de hidróxido de bário 1 N (solução estoque), preparar 100 mL de solução de hidróxido de bário 0,05 M (solução desejada).

Da mesma forma, inicialmente calcula-se quantos g de $Ba(OH)_2$ precisam para se preparar a solução desejada:

1 M ---- 1 mol de $Ba(OH)_2$ ---- 1000 mL solução

0,05 M ---- x mol $Ba(OH)_2$ ---- 1000 mL solução, assim x = 0,05 mol de hidróxido

0,05 M ---- 0,05 mol $Ba(OH)_2$ ---- 1000 mL solução

0,05 M ---- x mol $Ba(OH)_2$ ---- 100 mL solução, assim x = 0,005 mol de hidróxido

Convertendo mol em gramas tem-se: 1 mol $Ba(OH)_2$ ----- 171,3 g

0,005 mol ----- x g, assim x = 0,86 g

Portanto, precisa ser removido da solução estoque 0,005 mol ou 0,86 g de hidróxido, assim, calcula-se qual o volume correspondente na solução estoque que contenha este valor para preparar a solução desejada.

1N ---- 1 eqg $Ba(OH)_2$ ---- 1000 mL solução, onde 1 eqg de hidróxido = mol / 2, ou seja, 171,3 g / 2 = 85,65 g

Portanto, 1N ----- 85,65 g de hidróxido ----- 1000 mL solução

0,86 g $Ba(OH)_2$ ----- x mL solução = 10 mL solução

Assim, retira-se 10 mL de solução estoque, a qual contêm 0,005 mol ou 0,86 g de $Ba(OH)_2$, coloca-se em balão volumétrico de 100 mL e completa-se o volume com água destilada, para se obter a solução 0,05 M desejada.

3.2.4. FATOR DE DILUIÇÃO

No trabalho em laboratório também é muito comum expressar o fator de diluição de um determinado extrato ou solução.

Por exemplo, de 10 mL de uma solução de concentração conhecida, retira-se 1 mL e completa-se novamente o volume a 10 mL com solvente. O fator de diluição desta solução é dado por:

Suponha-se que nos 10 mL de solução tem-se 10 mg de uma substância, assim:

10 mL solução --- 10 mg da substância, ou seja, tem-se 1 mg da substância / mL da solução.

Ao retirar-se 1 mL da solução, retira-se 1 mg da substância, que ao completar o volume para 10 mL, permanecerá 1 mg da substância em 10 mL de solução; portanto tem-se 1 mg / 10 mL ou 0,1 mg / mL de solução.

Pela relação da quantidade da substância por mL de solução inicial e após a diluição final, tem-se: 1 mg / 0,1 mg = 10, que corresponde ao fator de diluição.

Aplicando este raciocínio à uma solução de concentração conhecida, como por exemplo de 100 mL de solução 0,1 N de KCl, da qual se remove 10 mL e completa-se novamente o volume com solvente a 50 mL, tem-se:

1 N --- 1 eqg KCl --- 1000 mL solução

0,1 N --- 0,1 eqg ---- 1000 mL solução

0,1 N --- 0,01 eqg ---- 100 mL solução

0,1 N --- 0,745 g ---- 100 mL solução, ou 0,00745 g ou 0,0001 eqg de KCl / mL de solução.

Destes 100 mL de solução retirou-se 10 mL, assim:

100 mL solução ---- 0,745 g de KCl

10 mL solução ----- 0,0745 g ou 0,001 eqg de KCl (0,00745g ou 0,0001 eqg por mL).

Assim, esta quantidade foi colocada em um recipiente e completado o volume a 50 mL, portanto tem-se:

0,0745 g de KCl em 50 mL solução; ou 0,00149 g ou 0,00002 eqg de KCl / mL solução

Portanto, fazendo a relação de concentração na solução inicial em relação a solução após a diluição, tem-se: 0,00745 g / 0,00149 g = 5; ou 0,0001 eqg / 0,00002 eqg = 5; que corresponde a diluição realizada (fator de diluição). Esta diluição corresponde a relação entre o volume final da solução (50 mL) e o volume da solução antes da diluição (10 mL), que corresponde a 50 mL / 10 mL = 5.

3.2.5. PADRONIZAÇÃO DE SOLUÇÕES DE CONCENTRAÇÃO MOLAR (M) E NORMAL (N)

É muito comum preparar soluções, mas a solução final não equivaler exatamente à concentração previamente desejada, devido a fatores como de higroscopicidade e volatilidade dos solutos, erros de pesagem ou erros de medidas. Além disso, a concentração da solução vai se alterando com o tempo, principalmente das soluções que contiverem algum composto ou solvente volátil.

Quando a concentração não for exatamente a desejada, pode-se inferir em grandes erros na quantificação de algum componente presente em pequena quantidade em uma amostra. Por isto, as soluções são padronizadas para se fazer uma correção da concentração, tentando corrigir ao valor da concentração real, utilizando-se de outras soluções previamente padronizadas ou que possuam maior estabilidade durante sua preparação.

Por definição, o fator de correção (f) é o fator que se multiplica a Normalidade aparente (N_a) ou Molaridade aparente (M_a) da solução preparada para se obter a Normalidade real (N_r) ou Molaridade real (M_r) (eq.3.1) desta solução.

f x (N_a ou M_a) = N_r ou M_r, assim: $\mathbf{f = N_r \text{ ou } M_r / N_a \text{ ou } M_a}$ (eq.3.1)

As soluções básicas, como de NaOH, podem ser padronizadas com solução de biftalato de potássio previamente seco, ou com soluções de ácido clorídrico ou ácido oxálico de concentrações conhecidas.

As soluções ácidas, como de HCl e H_2SO_4 normalmente são padronizadas com carbonato de sódio previamente seco.

Para fazer os cálculos sempre se utiliza a proporção estequiométrica, levando-se em consideração que a quantidade em equivalentes gramas de uma substância reage com a mesma quantidade em equivalentes gramas da outra substância e produzem a mesma quantidade em equivalentes gramas de cada um dos produtos.

Durante a padronização, como em qualquer titulação, o uso de bureta deve ser de graduação o mais próxima possível do volume gasto, ou seja, se na titulação gastar cerca de 17 mL, usar uma bureta de 25 mL ao invés de uma bureta de 50 mL.

Exemplo

Pretende-se padronizar uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N (normalidade aparente) com biftalato de potássio ($C_8H_5KO_4$), utilizando uma bureta de 25 mL. A solução a ser padronizada vai na bureta e a substância a ser utilizada para a padronização vai no erlenmeyer. Pode-se estimar o quanto da substância deve ser colocada no erlenmeyer, e para isso, utiliza-se da concentração e um volume estimado na titulação da solução a ser padronizada.

Partindo da concentração aparente da solução preparada de hidróxido de sódio, e estimando um gasto de 20 mL na titulação, obtém-se:

Solução de NaOH 0,1 N tem 0,1 eqg de NaOH em 1000 mL de solução. Prevendo o gasto de 20 mL de solução, teriam sido consumidos:

0,1 N base ---- 0,1 eqg base -----1000 mL solução

x eqg base -----20 mL, assim x = 0,002 eqg de base

Se fosse gasto estes 0,002 eqg da base, reagirá a mesma quantidade do biftalato, ou seja, 0,002 eqg de biftalato. Como 1 eqg de biftalato corresponde a 204 g, 0,002 eqg correspondem a 0,408 g ou 408 mg (0,002 eqg x 204 g / 1 eqg). Então se pesaria 408 mg do biftalato para colocar no erlenmeyer.

No entanto, se ao realizar a titulação fosse gasto 22 mL de solução de NaOH, qual seria o fator de correção (f)? Se acontecesse isso, já se saberia que a concentração do NaOH não seria de 0,1 N, porque se gastou mais de 20 mL de solução, e, portanto, estaria um pouco mais diluída.

O que se conhece com certeza é a massa de biftalato que reagiu, 408 mg ou 0,002 eqg. Portanto, no volume de 22 mL da solução de NaOH continha a mesma quantidade em equivalentes gramas, ou seja 0,002 eqg de NaOH.

Assim:

0,002 eqg de NaOH ----- 22 mL solução

x eqg NaOH ----- 1000 mL solução, assim x = 0,0909 eqg de NaOH / 1000mL equivale a Normalidade real da solução.

Assim, $f = N_r / N_a = 0,0909\ N / 0,1\ N = 0,9090$

Ou seja, multiplicando o fator de correção pela normalidade da solução preparada se obtém a normalidade real da solução de 0,0909 (0,9090 x 0,1 N).

3.2.6. NOÇÕES BÁSICAS DE ESTEQUIOMETRIA NA ANÁLISE DE ALIMENTOS

A estequiometria refere-se a cálculos matemáticos baseados em equações químicas. Os cálculos estequiométricos baseiam-se em proporções fixas entre as espécies (átomos, íons, moléculas) envolvidas em reações químicas. Estas proporções são indicadas por índices numéricos nas fórmulas, e coeficientes numéricos em equações químicas balanceadas. Isto se fundamenta em que toda reação química é governada pelas restrições matemáticas de conservação da massa e energia. No entanto, as variações de energia dos processos químicos são muito pequenas para serem detectadas como a variação de massa.

As proporções estequiométricas permitem o uso de pesos atômicos ou moleculares, em proporções simples, para os cálculos de quantidades reais de pesos e volumes, de gases, líquidos e soluções.

Uma equação balanceada representa não somente a transformação química que está acontecendo com átomos ou moléculas simples, mas também a reação que ocorre em qualquer escala. As proporções estequiométricas expressas pelos fatores numéricos na equação balanceada determinam as quantidades relativas de reagentes e produtos a qualquer nível. No entanto, mesmo não conhecendo o balanceamento da equação pode-se expressar a quantidade que reage pela relação de equivalentes gramas, onde a proporção de reação se baseia em que a quantidade em equivalentes gramas de um composto reage com a mesma quantidade em equivalentes gramas de qualquer outro composto, para formar a mesma quantidade em equivalentes gramas de cada um dos produtos.

Exemplo

Se durante a execução de uma técnica analítica mistura-se 50 mL de solução de ácido sulfúrico 0,2 N com 50 mmol de hidróxido de cálcio. Para saber as quantidades que reagiram dos reagentes e a quantidade de produtos formados, se relaciona com as proporções estequiométricas, baseado em que a mesma quantidade de equivalente grama de ácido reage com a mesma quantidade de equivalente grama de base, para formar a mesma quantidade em equivalentes gramas de cada um dos produtos.

Pela equação

50 mL de H_2SO_4 0,2 N + 50 mmol de $Ca(OH)_2 \rightarrow CaSO_4$ + H_2O

Portanto, inicialmente se calcula quantos equivalentes gramas de cada um reagente estão presentes.

Em 50 mL de ácido 0,2 N, se tem:

0,2 N --- 0,2 eqg --- 1000 mL solução

0,2 N --- x eqg --- 50 mL de solução, assim x = 0,01 eqg de ácido

Em 50 mmol de base, tem-se:

50 mmol x $1x10^{-3}$ = 0,05 mol ou 3,7 g (74 g x 0,05 mol) de base

Assim: em 50 mmol se tem 3,7 g ou 0,1 eqg (3,7 g x 1 eqg / 37 g) de base

Portanto, o reagente limitante é o ácido (0,01 eqg), assim irão reagir:

0,01 eqg H_2SO_4 + 0,01 eqg $Ca(OH)_2 \rightarrow$ 0,01 eqg $CaSO_4$ + 0,01 eqg H_2O

Observa-se que:

Reage todo o ácido sulfúrico presente (0,01 eqg).

Reagem apenas 0,01 eqg de base (0,37 g), portanto sobram 0,09 eqg, ou seja, 3,33 g da base não reagem.

Como produtos são formados 0,01 eqg de sal e 0,01 eqg de água.

CAPÍTULO

04 Determinações físico-químicas usuais em alimentos

4.1. DETERMINAÇÕES FÍSICAS EM PRODUTOS ENVASADOS

4.1.1. VÁCUO

Determina-se com auxílio de um vacuômetro antes de abrir a embalagem, ou antes de remover o selo de vedação, que consiste em uma pequena tampa central que é removida para a quebra do vácuo interno e facilitar a abertura da embalagem.

A aplicação do vácuo consiste na sucção do ar ou na injeção de vapor no espaço acima do alimento antes de fechar a embalagem, para expurgar parcialmente o ar presente na embalagem. Os teores de vácuo considerados adequados para embalagens de vidro e lata, estão entre 8 e 10 polegadas de Hg.

Um vácuo adequado é desejável em alimentos envasados porque reduz a quantidade de oxigênio interno na embalagem, e isto faz com que reduza a probabilidade de ocorrerem reações oxidativas com os nutrientes, como de vitaminas e pigmentos naturalmente presentes nos alimentos; de ocorrer a corrosão interna das embalagens metálicas; de evitar o desenvolvimento de microrganismos aeróbicos; além de reduzir a pressão interna dos recipientes, o que é desejável porque ocorre a dilatação do alimento no processo de esterilização, o que reduz a probabilidade de deformação dos recipientes durante o tratamento térmico.

Materiais

Vacuômetro.

Procedimento

1. Posicionar o vacuômetro em posição próxima ao centro da tampa da embalagem (para evitar deformação da tampa), e pressionar com firmeza.

2. Fazer a leitura direta no vacuômetro (precisa ser rápido porque ocorre a troca gasosa entre o interior do recipiente e meio externo).

4.1.2. ESPAÇO LIVRE

O espaço livre consiste no espaço entre a parte superior do líquido presente na embalagem e a parte inferior da tampa do recipiente. Esta medida é realizada com auxílio de paquímetro, tendo o cuidado de descontar a borda da embalagem acima da tampa.

É comum medir também a altura total da embalagem, após a remoção do seu conteúdo interno, e expressar o resultado como espaço livre %. Um determinado espaço livre mínimo é requerido nos recipientes, porque o enchimento excessivo pode ocasionar deformação dos recipientes durante os processos térmicos (devido a dilatação do material interno), além de prejudicar a transferência de calor por convecção.

Embalagens de produtos envasados que praticamente não apresentam espaço livre, normalmente vem associado a um teor inadequado de vácuo. O espaço livre deve ficar cerca de 10% do volume do recipiente.

Materiais

Parquímetro, abridor de lata.

Procedimento

1. Realizar a medida com o paquímetro das bordas superiores e inferiores ao da tampa, e após a medida da altura da lata.

2. Abrir cuidadosamente o recipiente e medir com o paquímetro a distância entre a parte superior da embalagem até o líquido de cobertura.

Cálculo

Descontar as medidas das bordas da tampa e do fundo do recipiente, e calcular o espaço livre %.

4.1.3. PESO LÍQUIDO

Consiste na determinação do peso de todo o conteúdo da embalagem, incluindo os sólidos e líquidos presentes.

Materiais

Balança sem-analítica, abridor de lata, béquer de 1 L.

Procedimento

1. Abrir a embalagem e remover todo o conteúdo interno para um béquer de 1 L previamente pesado.

2. Pesar o conteúdo interno da embalagem em balança semi-analítica.

Cálculo

Determinar o peso líquido pela diferença de peso do recipiente com o alimento e o recipiente vazio.

4.1.4. PESO DRENADO

Consiste em uma das principais determinações físicas do alimento, sendo sua apresentação obrigatória na embalagem. Esta determinação se faz após a remoção da calda ou salmoura que acompanha o produto. Para isto, se drena o conteúdo da embalagem sobre uma peneira, recolhendo a parte aquosa em outro recipiente, pesando os sólidos retidos na peneira.

A quantidade de sólidos corresponde ao peso drenado, o qual deve necessariamente estar dentro dos parâmetros apresentados na rotulagem.

Materiais

Béquer de 500 mL ou de 1 L, tamis, balança semi-analítica.

Procedimento

1. Escorrer todo o conteúdo da embalagem sobre um tamis por 2 minutos, recebendo a fase líquida em um béquer.

2. Transferir a fase sólida do tamis para um béquer e pesar o conteúdo dos sólidos em balança semi-analítica.

Cálculo

Expressar o peso drenado em gramas.

4.1.5. VOLUME DA FASE AQUOSA

O volume de calda ou salmoura também é importante em termos de manter um padrão de qualidade adequado do produto. Este volume é medido diretamente em proveta de volume adequado.

Materiais

Béquer de 250 mL, proveta de 250 ou 500 mL, tamis, balança semi-analítica.

Procedimento

1. Escorrer todo o conteúdo da embalagem sobre um tamis por 2 minutos, recebendo a fase líquida em um béquer.

2. Transferir o conteúdo líquido do béquer para uma proveta e anotar o volume.

Cálculo

Expressar o volume obtido na proveta em mL.

4.1.6. ANÁLISE VISUAL DA EMBALAGEM

As análises mais comuns realizadas com a embalagem de um alimento a ser analisado envolve a avaliação visual externa (verificação de amassamentos, pontos de corrosão), e avaliação visual interna (inclusive da tampa) pela avaliação de pontos de corrosão, liberação do verniz interno e presença de manchas escuras. Qualquer alteração interna da embalagem pode ser um indício de contaminação ou alteração da qualidade do produto envasado.

Procedimento

Realizar a inspeção visual detalhada da parte externa e interna da embalagem, anotando eventuais defeitos.

4.2. DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

4.2.1. DENSIDADE (ρ)

A densidade representa a quantidade de massa por unidade de volume de uma substância. Um termo associado a densidade é a gravidade específica, que representa a densidade de um fluido em relação a densidade da água. Se a densidade for medida a 4^0C ($\rho H_2O = 1,00$), a gravidade específica será numericamente igual a sua densidade.

Todas as substâncias possuem uma densidade específica, a qual varia em função da temperatura e de sua concentração. Portanto, em uma amostra alimentícia, a densidade final é representada em função dos componentes presentes, e de suas concentrações na amostra.

A determinação da densidade possui ampla aplicabilidade, pois estão disponíveis tabelas (AOAC), nas quais se correlaciona a densidade de um determinado produto com a concentração de um determinado componente.

A densidade expressa a relação entre a massa (m) e volume (V) de uma determinada substância ou mistura, sendo normalmente expressa como:

Densidade absoluta = m (kg ou g) / V (dm^3 ou cm^3), do líquido em uma determinada temperatura.

Densidade relativa (gravidade específica) = m V / m_1 V_1; relação da massa de um líquido (m) pela massa do mesmo volume de água pura (m_1), ambas à mesma T ^{0}C.

O método mais comum de determinar a densidade consiste na medida do peso de um volume de amostra conhecido, colocada em um recipiente de vidro apropriado, denominado de picnômetro.

Alguns dispositivos foram desenvolvidos para medir a densidade de determinadas soluções, baseado no princípio de que volumes de diferentes líquidos deslocados pelo mesmo corpo são inversamente proporcionais às densidades destes líquidos ($V_1 \times \rho_1 = V_2 \times \rho_2$). Se o corpo que desloca o líquido for um cilindro de diâmetro uniforme, os volumes deslocados são inversamente proporcionais à profundidade que o cilindro mergulha ($\rho_1 / \rho_2 = h_2 / h_1$). Estes dispositivos são constituídos por um cilindro oco de vidro e uma haste superior estreita, a qual contém uma escala relativa ao composto que está sendo medido, e uma escala de temperatura, para se fazer a correção da leitura em função da temperatura.

As escalas dos hidrômetros estão calibradas em unidades de densidade ou em composição proximal de algum componente relacionado com a densidade, como os alcoômetros (usados para determinar o percentual de álcool por volume), lactômetros (usados para determinar a densidade do leite), sacarômetros (usados para determinar o percentual de açúcar em caldas), salômetros (usados para determinar a concentração salina em salmouras) e oleômetros (usados para determinar densidade de óleos).

Materiais

Picnômetro, balança analítica, papel absorvente, funil de vidro, algodão.

Procedimento

1. Pesar o picnômetro vazio, depois preencher o picnômetro com água destilada a 20 ^{0}C, limpar com papel absorvente e pesar.

2. Colocar o suco/calda/salmoura até preencher totalmente o picnômetro, secar com papel absorvente e pesar.

Cálculo

Densidade absoluta do suco/calda/salmoura= m / V

Densidade relativa do suco/calda/salmoura= [m / V] / [m_1 / V_1]

Onde, m= massa do suco/calda/salmoura (g); V= volume do suco/calda/salmoura (mL ou cm^3); m_1= massa da água a 20 ^{0}C (g); V_1= volume da água a 20 ^{0}C (mL ou cm^3).

4.2.2. ÍNDICE DE REFRAÇÃO E SÓLIDOS SOLÚVEIS

Esta análise consiste na determinação de todos os sólidos solúveis presentes na amostra, baseado na medida do índice de refração da amostra. O índice de refração é definido em relação ao seno do ângulo de incidência da luz pelo seno do ângulo do raio refratado. Como o índice de refração pode variar com o comprimento de onda e a temperatura, definiu-se como padrão a medida do índice de refração com a luz de sódio monocromática (589 nm) a 20 ^{0}C.

Cada substância, ligação ou grupo específico, apresenta um índice de refração definido; portanto, o índice de refração de uma amostra consiste na contribuição do índice de refração de seus diferentes componentes. Portanto, o índice de refração varia com a temperatura, e com a concentração da amostra.

O índice de refração é medido em refratômetros, que consistem em aparelhos de precisão compostos de uma lente interna, tendo um prisma de medição e outro prisma de iluminação, tendo na parte oposta aos prismas uma ocular regulável.

O prisma de medição apresenta-se na parte fixa do refratômetro, e o prisma de iluminação constitui-se em uma parte móvel, para facilitar a colocação da amostra a analisar e para se efetuar a sua limpeza.

Nos refratômetros, a medida é visualizada nos limites das faixas clara (dada pela luz refratada no prisma) e escura (ocasionada pela não refração ou reflexão total da luz), denominado de raio crítico. Estas faixas são facilmente visualizadas em prismas de Amici, utilizando luz amarela para favorecer a nitidez da separação das faixas. Como cada substância possui um ângulo crítico (em relação ao raio crítico), esta medida é utilizada para identificar o índice de refração de cada substância.

Os refratômetros de bancada ou refratômetros de Abbé são os mais utilizados, nos quais tem a circulação de água interna para padronizar a temperatura no prisma de medição e a luminosidade é conferida por uma luz interna.

Como o grande percentual de sólidos solúveis em frutas e em seus subprodutos consistem em açúcares, os quais contêm apenas pequena quantidade de ácidos orgânicos, é comum realizar esta determinação e relacionar como sendo sua concentração em açúcares (ficando um valor muito próximo do valor real). A medida dos sólidos solúveis é expressa em graus Brix (^{0}Brix), sendo observada em uma escala específica nos refratômetros. Além dos refratômetros de bancada, vários outros refratômetros manuais são normalmente utilizados em laboratórios e indústrias de alimentos, e na maioria destes não há o controle de temperatura, e a luminosidade consiste na luz natural; portanto, as medidas de sólidos solúveis são aproximadas. Existem vários modelos de refratômetros manuais no mercado, com escalas de 0-100 ^{0}Brix ou com escalas parciais. Para reduzir erros de leitura, recorre-se a tabelas onde pode-se estimar o ^{0}Brix mais adequado, fazendo uma correção em função da temperatura da amostra.

Materiais

Refratômetro, banho de água, algodão, água destilada, papel absorvente.

Procedimento

1. Calibrar o refratômetro ajustando a temperatura do banho de água circulante a 20 ^{0}C, e colocar algumas gotas de água destilada sobre o prisma. A linha divisória da leitura deve coincidir com o zero da escala do Brix, e o índice de refração da água de 1,3330.

2. Colocar 1-2 gotas de suco (à temperatura ambiente) filtrado sob algodão diretamente sobre o prisma do refratômetro. Quando a amostra for consistente, colocá-la diretamente sobre o prisma sem prévia filtração.

3. Ajustar o campo visual no refratômetro, e deixar a interface do claro e escuro no meio do X da ocular da direita.

4. Fazer a leitura a 20 ^{0}C na ocular da esquerda, sendo que na escala à esquerda visualizada nesta ocular se faz a leitura do índice de refração e na escala à direita se faz a leitura dos sólidos solúveis, expressos em ^{0}Brix.

5. Após cada determinação deve-se limpar os prismas com água destilada ou álcool, e depois de estarem limpos deve-se enxugá-los com papel absorvente, sempre cuidando para não causar ranhuras nos prismas.

4.2.3. POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH)

O pH corresponde na leitura de íons hidrogênios efetivamente dissociados na solução (pH = - log H^+). Consiste em uma determinação muito importante para caracterizar a acidez natural, atividade enzimática, estabilidade de componentes, verificação de estado de maturação de frutos e estado de conservação do alimento.

Em termos de processamento, a determinação do pH consiste em uma determinação muito importante para a definição do tratamento térmico que se deve aplicar aos alimentos, em função da possibilidade de desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Alimentos com pH superior a 4,5 são considerados de baixa acidez (ervilha, milho, feijão, carnes), e, portanto, possíveis de desenvolvimento de *Clostridium botulinum*, e por isto devem ser submetidos a temperaturas de processamento superior ao do ponto de ebulição da água (121 ^{o}C / 20 minutos). Alimentos de acidez inferior a 4,5 são considerados de alta acidez (tomates, picles, frutas em geral), e não propiciam o desenvolvimento de *Clostridium botulinum*, e, portanto, podem ser submetidos a temperaturas inferiores, mas próximas, ao ponto de ebulição da água (processo de pasteurização).

Os processos que avaliam o pH são colorimétricos ou eletrométricos. Nas determinações colorimétricas são utilizados indicadores específicos, os quais produzem ou alteram sua coloração em determinadas concentrações de íons hidrogênios. Os indicadores podem ser de papel ou sólidos, que em solução induzem uma coloração diferenciada em função do pH do meio.

Nos processos eletrométricos empregam-se potenciômetros (pHmetros), os quais permitem uma determinação direta do pH. No pHmetro, a medida é feita por um eletrodo de medida e um de referência, expressando o resultado em escalas de pH de 1 a 14.

O eletrodo de medida normalmente é de vidro, o qual não é atacado por agentes oxidantes e redutores, podendo ser operado em ampla faixa de pH. No extremo do eletrodo há um bulbo constituído de uma membrana de vidro permeável, seletivo aos íons hidrogênio, os quais são depositados na membrana, induzindo uma diferença de potencial

elétrico que se desenvolve através da membrana, o qual é medido pelo aparelho e expresso o valor do pH do meio.

O eletrodo de referência (o mais utilizado é o eletrodo de Calomelano) possui um potencial fixo e independente das propriedades da solução. Este eletrodo é localizado no interior do eletrodo de vidro, e mede o potencial gerado através de uma ponte salina (localizada em sua extremidade) de solução de KCl.

Antes de iniciar qualquer medida deve-se calibrar o aparelho com soluções tampões. Cuidados especiais devem ser tomados quando se determina o pH de substâncias muito ácidas e básicas ou oleosas, devendo-se utilizar de eletrodos especiais.

A temperatura do aparelho deve ser ajustada em função da temperatura da amostra, porque o pH da amostra varia de acordo com a temperatura, pela maior ou menor dissociação dos íons em solução. Vários pHmetros possuem compensação automática da leitura em função da temperatura da solução.

Os eletrodos devem ser mantidos sempre em solução aquosa ou de KCl diluída (2 a 3%, m/v), para evitar a desidratação da membrana. Quando se coloca o eletrodo na amostra, liga-se a tensão do aparelho, desligando-se novamente antes de removê-lo da amostra. Após o uso os eletrodos devem ser lavados com água destilada, e após secos com papel absorvente, com cuidado para evitar ranhuras no eletrodo, e armazenados na solução de KCL.

Materiais e reagentes

Béqueres de 50 mL e 250 mL, aparelho medidor de pH (pHmetro), lenço de papel, soluções tampão 4,0, 7,0 e 10,0.

Procedimento

1. Ligar o pHmetro e deixar estabilizar por 20 minutos, ajustar a temperatura do aparelho (o ajuste interno fica fixo).

3. Calibrar o aparelho com os tampões 4,0; 7,0; e 10,0 (alguns aparelhos ajustam somente no 4,0 e 7,0).

4. Fazer a leitura diretamente na amostra, se ela for líquida ou pastosa. Caso contrário (para sólidos), pesar 10 g da amostra em béquer de 250 mL, adicionar 100 mL de água, recentemente fervida e fria. Agitar periodicamente o conteúdo do frasco até que as partículas fiquem uniformemente suspensas, pelo período de 30 minutos, após fazer a leitura do pH. Se não houver dissolução completa, decantar o líquido sobrenadante para um frasco seco e fazer a leitura do pH.

5. Desligar da tensão, lavar os eletrodos com água destilada e fazer sua imersão na solução de descanso (KCl).

Obs. No momento de fazer a leitura do pH na amostra, manter o bulbo do eletrodo dentro da amostra. Manter sempre os eletrodos dentro da amostra quando ele estiver ligado na tensão, e desligar no momento de sua lavagem e transferência de amostra/lavagem/solução de descanso de KCl a 3%.

4.2.4. ACIDEZ

A determinação de acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação de um produto alimentício. Os ácidos orgânicos presentes em

alimentos influenciam o sabor, odor, cor e estabilidade, o que infere diretamente na qualidade do alimento.

A acidez de um alimento pode ser resultado dos compostos naturalmente presentes, dos adicionados aos alimentos durante o processamento, e devido a alterações nos alimentos resultantes de processos de hidrólise, oxidação ou fermentação.

Normalmente a acidez diminui durante o processo de maturação de um fruto, enquanto a concentração de açúcar aumenta. Como a acidez de um alimento é mascarado pela presença de açúcar, é muito comum relacionar ºBrix / acidez, para expressar o grau de maturação e aceitabilidade sensorial de frutas.

A determinação da acidez pode ser realizada por métodos que contabilizam a acidez total (ou titulável) ou a acidez volátil. A determinação da acidez total baseia-se em titular com soluções de álcali-padrão todos os ácidos, tanto os dissociados quanto os não dissociados presentes no produto. Amostras coloridas podem prejudicar a visualização do ponto de viragem, e quando isto ocorre, pode-se reduzir a quantidade de amostra utilizada, ou diluir a amostra com uma quantidade maior de água, ou ainda determinar o ponto de viragem com o auxílio de um potenciômetro pela medida do ponto final da titulação pelo valor do pH.

A determinação da acidez volátil pode ser realizada pela evaporação dos ácidos voláteis presentes, principalmente do ácido acético. Para isto, se determina a acidez inicial, e após evapora-se os ácidos voláteis e determina-se novamente a acidez (acidez fixa). Pela diferença da acidez total e da acidez fixa se obtém a acidez volátil.

O ponto de equivalência durante a titulação ocorre quando o número de equivalentes do ácido presente na amostra se iguala ao número de equivalentes da base usada na titulação. Para visualizar este ponto é usado um indicador apropriado; no entanto, o ponto de viragem indica uma aproximação do ponto de equivalência, e não o valor real do ponto de equivalência (o qual poderia ser medido em um pHmetro). Vários indicadores podem ser utilizados, em reações de neutralização a fenolftaleína é o principal.

A diluição da amostra é realizada com água, para amostras hidrofílicas; com solventes orgânicos para amostras lipofílicas; e em alguns casos, como para o leite, não há necessidade de diluição porque se utiliza um volume maior de amostra.

A acidez pode ser expressa em mL de solução normal por cento ou em percentual do ácido majoritário do produto. Os principais ácidos orgânicos encontrados em sementes, frutos e hortaliças são o ácido cítrico (limão, laranja, figo, pêssego, abacaxi, pera, morango, tomate), málico (maçã), oxálico (alguns vegetais verdes como o espinafre, alface, brócolis), tartárico (uva, tamarindo) e ácido oleico (presente em óleos e gorduras). Embora estes sejam os ácidos predominantes, não são encontrados de uma forma isolada nas amostras alimentícias.

4.2.4.1. ACIDEZ TITULÁVEL TOTAL (AMOSTRAS HIDROFÍLICAS)

Materiais e reagentes

Frasco erlenmeyer de 125 ou 250 mL, bureta de 10 mL, indicador fenolftaleína a 1% (m/v), solução de hidróxido de sódio 0,1 N, biftalato de potássio.

Procedimento

1. Pesar cerca de 2 g da amostra sólida (2 mL de amostra líquida) em um frasco erlenmeyer de 125 mL, e adicionar 25 mL de água destilada. Para amostras que contêm acidez muito baixa, pode-se colocar cerca de 5 g (5 mL) de amostra em erlenmeyer de 250 mL.

2. Adicionar 2 gotas do indicador fenolftaleína a 1%, e titular com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, até coloração rósea permanente por 30 segundos.

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas de base gastos na titulação, que corresponde a quantidade de equivalentes gramas do ácido presente na amostra, expressando em % (m/m) ou % (m/v) de ácido.

Exemplo

Se ao titular 2 mL de um suco de abacaxi gastou-se 3 mL de solução de NaOH 0,1 N (fc = 0,9897), a acidez em ácido cítrico % (m/v) será:

0,1 N x 0,9897= 0,09897 N, assim: se tem 0,09897 eqg de NaOH em 1000 mL de solução.

Como gastou-se 3 mL na titulação, neste volume contém 0,0002969 eqg de NaOH : (3 mL x 0,09897 eqg / 1000 mL).

Portanto, se tem exatamente a mesma quantidade em equivalentes gramas do ácido no suco, ou seja 0,0002969 eqg de ácido, nos 2 mL de suco.

O ácido majoritário no suco de abacaxi é o ácido cítrico (PM = eqg = 64,02 g), assim se tem 0,0191 g de ácido (0,0002969 eqg x 64,02 g / 1 eqg) em 2 mL de suco.

Calculando para 100 mL de suco se obtém 0,95% m/v (100 mL x 0,0191 g / 2 mL) de ácido cítrico.

Também se pode calcular utilizando as fórmulas:

Acidez em solução normal % (v/m) = [V x N x f x 100] / P

Acidez em ácido (nome do ácido) por cento (m/m) = [V x eq.g ácido x 100] / P

Onde, V = nº de mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação, f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio, P = g ou mL da amostra usado na titulação, Eq.g ácido = equivalentes gramas do ácido que corresponde aos equivalentes gramas de 1 mL de NaOH na Normalidade utilizada na titulação.

Obs. Eq.g de alguns ácidos orgânicos: cítrico = 64,02 g; málico = 67,04 g; tartárico = 75,04 g; acético = 60,04 g; oxálico = 45,01 g; láctico = 90,08 g; oleico = 282 g.

4.2.4.2. ACIDEZ FIXA

Materiais e reagentes

Banho maria, cápsula de porcelana ou béquer de 50 mL, frasco erlenmeyer de 125 ou 250 mL, bureta de 10 mL, indicador fenolftaleína a 1% (m/v), solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

Procedimento

1. Determinar a acidez total.

2. Colocar cerca de 2 g ou 2 mL de amostra em cápsula de porcelana, diluir com 10 mL de água, evaporar em banho maria até secar, adicionar 10 mL de água, e evaporar até secar novamente.

3. Esfriar e transferir para erlenmeyer de 250 mL com auxílio de 100 mL de água previamente fervida e fria, adicionar 3 gotas de fenolftaleína a 1% e titular com solução de NaOH 0,1 N até coloração rósea persistente por 30 segundos.

Cálculo

O cálculo segue o mesmo procedimento utilizado para a determinação da acidez titulável total.

4.2.4.3. ACIDEZ VOLÁTIL

Calcula-se pela diferença do conteúdo de acidez titulável total e da acidez fixa.

Acidez volátil % (m/v) = acidez titulável total % - acidez fixa %

Obs. Caso se queira expressar em algum ácido específico, deve-se expressar a acidez total e a acidez fixa com o mesmo ácido, ou expressar a acidez volátil no ácido específico apenas após o cálculo final.

4.2.4.4. ACIDEZ DE AMOSTRAS GORDUROSAS (AMOSTRAS LIPOFÍLICAS)

Materiais e reagentes

Erlenmeyer de 125 mL, bureta de 25 mL, solução neutra de éter etílico : álcool etílico (2+1, v/v), fenolftaleína 1% (m/v), solução de NaOH 0,1N.

Procedimento

1. Pesar 2 g de amostra no estado líquido em erlenmeyer de 125 mL.

Obs. Se a amostra for sólida, deixar liquefazer em banho maria a 40 ^{0}C.

2. Adicionar 25 mL de solução éter: álcool (2+1, v/v), agitar, adicionar 2 gotas de fenolfataleína 1%, e titular com solução de NaOH 0,1 N até coloração rósea.

Cálculo

O cálculo é o mesmo que se faz para a acidez titulável total, expressando o resultado em ácido oleico % (m/m).

4.2.4.5. ACIDEZ EM GRAUS DORNIC (^{0}D)

Materiais e reagentes

Erlenmeyer de 125 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, fenolftaleína 1% (m/v), solução de NaOH N / 9.

Procedimento

1. Pipetar com pipeta volumétrica 10 mL de leite de amostra em erlenmeyer de 125 mL.

2. Adicionar 4 gotas de fenolfataleína 1% e titular com solução de NaOH N / 9 até coloração rósea persistente.

Cálculo

0,1 mL de solução de NaOH N / 9 = 1 grau Dornic (1 ^{0}D).

4.2.5. CLORETOS

Esta técnica é muito útil para se determinar a quantidade de cloreto de sódio presente em alimentos, principalmente no sal puro e em produtos envasados com salmoura, como em milho em conserva, azeitonas, ervilhas, aspargo e conservas em geral.

O método mais utilizado fundamenta-se na precipitação dos cloretos sob a forma de cloreto de prata, em pH 8,3; utilizando o cromato de potássio como indicador.

Materiais e reagentes

Balança analítica, balão volumétrico de 100 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, Béquer de 250 mL, bureta de 50 mL, bico de Bunsen, bastão de vidro, cápsula de porcelana, solução de ácido nítrico (1+9), solução de nitrato de prata 0,1 N, solução de cromato de potássio a 5% (m/v), carbonato de cálcio.

Procedimento

1. Secar a cápsula de porcelana em mufla a 550 ºC por 1 hora, resfriar em dessecador até temperatura ambiente e pesar em balança analítica.

2. Pesar cerca de 3 gramas de amostra previamente triturada e homogeneizada, carbonizar a amostra em temperatura baixa, em bico de Bunsen ou similar, e após incinerar em mufla a 550 ºC por 3-4 horas (observar até que a cinza se torne de coloração cinza-claro).

3. Adicionar 2-3 gotas de ácido nítrico (1+9) e 10 mL de água quente, agitar com bastão de vidro, filtrar com auxílio de água quente em béquer de 250 mL.

4. Neutralizar o filtrado com carbonato de cálcio, e adicionar um excesso de 0,5 g, depois aquecer em banho maria até não haver mais desprendimento de gás carbônico.

5. Esfriar, adicionar 1 mL de solução de cromato de potássio a 5%, e titular com solução de nitrato de prata 0,1 N, até aparecimento de coloração amarelo - avermelhada (vermelho tijolo).

Obs. Para a determinação de cloretos no cloreto de sódio puro (NaCl), pode-se simplificar a técnica, pesando 2 g de sal em balão de 100 mL, completando o volume com água, transferindo 10 mL para erlenmeyer junto a 50 mL de água e 2 gotas de solução de cromato de potássio a 10% (m/v), e após titulando com solução de nitrato de prata 0,1 N.

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas de nitrato de prata gastos na titulação, que corresponde a quantidade de equivalentes gramas de cloretos presente na amostra, expressando em % (m/m) de cloreto de sódio.

Exemplo

Ao titular 10 g de uma salmoura gastou-se 4,5 mL de nitrato de prata 0,1 N (fc = 1,0467). Assim, a quantidade de nitrato em equivalentes gramas gastos foram 0,00047 eqg (0,10467 eqg x 4,5 mL / 1000 mL). Portanto, havia na amostra 0,00047 eqg de sal. Expressando em cloreto de sódio se tem 0,0275 g de sal (0,00047 eg x 58,5g / 1 eqg). Calculando em % se obtém 0,28% m/m (0,0275 g x 100 / 10 g).

Também se pode utilizar a fórmula

% de cloretos (m/m), em cloreto de sódio = (V x f x 0,00585 x 100) / P

Onde: V= volume de solução de nitrato de prata gasto; f = fator de correção da solução de nitrato de prata; P= gramas de amostra.

4.2.6. TEOR DE IODO EM SAL

Consiste na determinação por volumetria de iodo adicionado ao sal de cozinha, na forma de iodeto ou iodato de potássio, o qual é adicionado para evitar o desenvolvimento de bócio em humanos.

O iodato de potássio (KIO_3) presente no sal reage com o iodeto de potássio (KI) em meio ácido, liberando o iodo (I_2), o qual é então titulado com tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$).

Pela legislação brasileira, o sal destinado ao consumo humano deve conter iodo na proporção de 15 a 45 mg de iodo a cada quilo de produto, conforme estabelece a Resolução RDC nº 23/2013 (ANVISA, 2013).

Materiais E Reagentes

Balança analítica, béquer de 400 mL, pipeta de 10 mL, bureta de 10 mL, ácido sulfúrico 2 N, solução de iodeto de potássio 10% (m/v), solução de amido 1% (m/v), solução de tiossulfato de sódio 0,005 N.

Procedimento

1. Pesar 10 g de amostra em béquer de 400 mL, e dissolver com 200 mL de água destilada.

2. Adicionar 1 mL de solução de ácido sulfúrico 2 N, mais 5 mL de solução de iodeto de potássio a 10% e 1 mL de solução de amido a 1%.

3. Titular com solução de tiossulfato de sódio 0,005 N, até desaparecimento de cor azul.

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas de tiossulfato de sódio gastos na titulação, que por ser uma reação de oxiredução, corresponde a seis vezes a quantidade de equivalentes gramas de iodo liberado na reação, pela reação do iodato de potássio com o iodeto de potássio, expressando em % (m/m) de iodo.

Exemplo

Ao titular 10,56g de sal gastou-se 2,3 mL de solução de tiossulfato de sódio 0,005N (fc = 0,9321). Assim, a quantidade de tiossulfato em equivalentes gramas gastos foram (0,004661 eqg x 2,3 mL) / 1000 mL= 0,00001072 eqg. Portanto, havia na amostra 0,00001072 / 6 = 0,000001787 eqg de iodo. Expressando em iodo: (0,000001787 egg x 126,9 g) / 1 eqg = 0,0002267 g ou 0,2267 mg. Calculando em mg / Kg: 0,2267 mg x 1000 g) / 10,56 g = 21,47 mg / Kg.

Também se pode utilizar a fórmula

Iodo mg / kg = (V x f x 105,8) / P

Sendo, V= volume de solução de tiossulfato de sódio, f= fator de correção da solução de tiossulfato de sódio, P= gramas de amostra.

4.2.7. TEOR ALCÓOLICO

Esta determinação é realizada por destilação do álcool presente em bebidas alcoólicas, bebidas alcoólicas destiladas e fermento destiladas, vinagres e similares, as quais podem conter conteúdos de até 55% em álcool.

Materiais e reagentes

Balão volumétrico de 250 mL, balão de destilação de 500 mL, proveta de 50 mL, condensador de Liebig, termômetro, alcôometro de Gay-Lussac.

Procedimento

1. Ajustar a temperatura da amostra a 20 ^{0}C, e transferir para balão volumétrico de 200 mL.

2. Transferir toda amostra para balão de destilação de 500 mL, com auxílio de 50 mL de água (para vinagres é aconselhável neutralizar o conteúdo no balão de destilação com NaOH 5 N, e com auxílio de papel indicador).

3. Destilar a amostra, recebendo 180 mL do destilado em proveta, e transferir para balão volumétrico de 250 mL.

4. Ajustar a temperatura a 20 ^{0}C, completar o volume com água destilada.

5. Transferir para proveta de 250 mL, e introduzir o termômetro e o alcoômetro de Gay-Lussac.

Cálculo

O percentual de álcool em volume (v/v) é dado pela leitura direta no alcoômetro.

O percentual de álcool em peso (m/v) se calcula através da densidade do álcool, sabendo-se que a densidade do álcool etílico a 20 ^{0}C é igual a 0,80 g / mL.

Exemplo

Ao final da análise de um licor obteve-se 35% (v/v) de álcool. Este volume corresponde a 28% (m/v) de álcool (35 mL x 0,80 $g.mL^{-1}$ / 1 mL).

4.2.8. TESTE QUALITATIVO DA PEROXIDASE

Este teste é utilizado para testar a eficiência do branqueamento de frutas e hortaliças realizado antes de seu congelamento e armazenamento. Esta enzima tem-se mostrado a mais termo resistente, por esse motivo este teste é usado como indicador da eficiência do tratamento térmico para inativação de enzimas. A peroxidase catalisa a oxidação de um aceptor (geralmente um composto fenólico, como o guaiacol), resultando em compostos de cor amarelo escuro ou marrom (tetraguaiacol).

Materiais e reagentes

Erlenmeyer de 250 mL, peróxido de hidrogênio (10 a 20 V), solução de guaiacol 1% (m/v), balão de 100 mL, béquer de 250 mL.

Procedimento

1. Colocar cerca de 15 g de amostra em béquer de 250 mL.

2. Adicionar 20 mL de uma mistura 1:1 (v/v) de solução de peróxido de hidrogênio: solução de guaiacol a 1%, e esperar 1 minuto.

Resultado

Com o desenvolvimento de cor vermelho-castanho o teste é considerado positivo.

CAPÍTULO

05 Análises relacionadas com a composição proximal de alimentos

A composição proximal (centesimal) de alimentos corresponde na determinação dos macronutrientes presentes no alimento (proteínas, gorduras, cinzas, fibras e carboidratos), incluindo ainda o teor de umidade.

5.1. UMIDADE

Quantitativamente a água é um dos principais componentes dos alimentos, a qual se encontra presente sob diferentes graus de ligações. A água total a ser removida do alimento pode estar livre nos tecidos, retida fisicamente por determinados componentes (como carboidratos e proteínas), e ligada em diferentes graus de interações com os componentes alimentícios.

Água livre é aquela que se pode evaporar do material pelo calor como se fosse pura, ou seja, sua pressão de vapor é igual a pressão de vapor da água pura. Água ligada é aquela combinada em diferentes graus de interações, fracas, moderadas ou fortes, por forças físicas (atribuíveis as forças de Van der Waals, interações iônicas, interações dipolo-dipolo ou à formação de pontes do H) aos componentes macromoleculares e coloidais hidrofílicos, como proteínas e polissacarídeos. Quanto mais ligada com outros componentes estiver a água, menor será sua pressão de vapor ao comparar com a pressão de vapor da água pura, e mais difícil se torna sua remoção, assim, maiores temperaturas ou tempos terão que ser utilizados.

A umidade de um alimento corresponde a perda em peso ocorrida no produto quando aquecido em condições nas quais o total da água for removida, no entanto, outras substâncias também se volatilizam juntamente com a água, mas em termos quantitativos são irrelevantes. O resíduo obtido após o aquecimento direto da amostra é denominado de resíduo seco ou, mais comumente como sólidos totais.

A determinação do conteúdo de umidade em produtos alimentícios é muito importante para os processadores de alimentos, por ser um fator de qualidade dos produtos alimentícios. O conteúdo de água pode afetar a estabilidade de frutas e hortaliças desidratados, alimentos em pó, dentre outros. O conteúdo de umidade ou sólidos totais é frequentemente especificado na composição padrão, isto é, nos padrões de identidade de um alimento; e os dados de umidade podem ser usados para expressar resultados de outras análises em uma base uniforme (peso em base seca).

Dependendo do método de determinação de umidade podem ocorrer pequenas variações na determinação da quantidade de água presente, devido as diferentes formas de interações da água com os componentes alimentares, e possíveis degradações de componentes.

Além das metodologias usuais, outros métodos têm sido desenvolvidos em aplicações mais específicas, como a determinação da umidade em alimentos através de destilação com líquidos imiscíveis, micro-ondas, balanças de infravermelho, espectrofotometria no infravermelho, métodos elétricos (dielétrico, condutividade), pelo ponto de congelamento, ressonância magnética nuclear e pelo índice de refração.

Na determinação em balanças de infravermelho, são utilizadas lâmpadas especiais que desenvolvem altas temperaturas (2000-2500 K), assim o calor penetra rapidamente na amostra, e a leitura do conteúdo de água é realizada diretamente no equipamento, tendo a vantagem de ser uma análise rápida. Outro método utilizando o infravermelho, baseia-se na determinação por espectrofotometria na região do infravermelho, que se baseia na capacidade de absorção de energia pelas moléculas de água na região do infravermelho próximo (1,93 μm).

5.1.1. AQUECIMENTO EM ESTUFA COMUM

O processo mais usual para a determinação de umidade é o aquecimento direto da amostra em estufas, em temperaturas pouco superiores ao ponto de ebulição da água (105-110 ºC). Este método é aplicável a todos os produtos alimentícios, exceto para os que possam conter alto conteúdo de compostos voláteis distintos da água, ou que são suscetíveis a decomposição nesta temperatura. A aplicação de altas temperaturas em estufas pode induzir a volatilização de compostos não aquosos, decomposição térmica de componentes instáveis e interação de componentes, o que pode resultar na formação de umidade adicional ou de outras substâncias que são voláteis, além da oxidação de componentes susceptíveis ao oxigênio. Apesar dessas desvantagens, as técnicas de determinação por aquecimento em estufa continuam a serem empregadas pela sua facilidade, baixo custo, e por fornecerem, na maioria das vezes, resultados reproduzíveis e dentro de parâmetros aceitáveis.

Materiais

Cápsula de alumínio ou pesa-filtro, pinça, espátula, balança analítica, estufa, dessecador.

Procedimento

1. Colocar a cápsula de alumínio (ou pesa-filtro) limpa em estufa a 105 °C por 1 hora, esfriar em dessecador e pesar em balança analítica.

2. Pesar diretamente na cápsula cerca de 5 a 10 g de amostra previamente triturada e homogeneizada, e colocar na estufa a 105 °C por 4-5 horas.

3. Deixar esfriar no dessecador até atingir a temperatura ambiente, e após pesar.

4. Repetir as operações de aquecimento (por cerca de 1 hora) e resfriamento até peso constante (a diferença de peso não pode ser maior que 0,5 mg / g de amostra).

Observações

- Após a pesagem das cápsulas, não as pegar com as mãos, sempre utilizar uma pinça ou papel absorvente.
- Se a amostra for líquida, deve-se inicialmente evaporar em banho maria até atingir consistência pastosa para evitar respingos.

- Em amostras com altos teores de açúcares, é comum a adição de asbestos ou pequena quantidade de areia (limpa e seca), para evitar a formação de crosta dura na superfície, o que dificulta a remoção da água.
- Deve-se espalhar bem as amostras na base do recipiente de secagem.
- A sílica anidra que vai no dessecador é comercializada com coloração azul, se estiver esbranquiçada é uma indicação que está úmida. Para remover a umidade deve-se levar à estufa por 1-2 horas a 105 ^{0}C, até ficar novamente azul.

Cálculo

Expressar em umidade % (m/m), pela diferença de peso da amostra úmida e da amostra seca, expressando o conteúdo de água removido em 100 g de amostra.

Exemplo

Pesando 6,4578 g de amostra úmida e após a determinação da umidade restou 1,2682 g (descontado o peso da cápsula), significa que na amostra úmida havia 5,1896 g de água e 1,2682 g de matéria seca. Portanto, a umidade % (m/m) é de 80,36% (5,1896 g x 100 / 6,4578 g).

EXPRESSÃO EM BASE SECA (MATÉRIA SECA) E EM BASE ÚMIDA (MATÉRIA ÚMIDA)

Após a determinação de umidade de um alimento, qualquer nutriente ou componente alimentar pode ser expresso em base seca (b.s.) ou base úmida (b.u.), também expressos em matéria seca (m.s.) ou matéria úmida (m.u.).

Exemplo

Se nesta amostra de 6,4578 g, com teor de umidade de 80,36% (m/m), conter 452 mg de um determinado nutriente, o percentual deste nutriente seria:

Nutriente % (m/m) em b.u. = (0,452 g x 100) / 6,4578 g = 6,70%.

Nutriente % (m/m) em b.s. = (0,452 x 100) / 1,2682 g = 35,64%.

5.1.2. AQUECIMENTO EM ESTUFA À VÁCUO

Amostras que se decompõem ou que passam por transformações na temperatura de ebulição da água, como nas amostras com altos teores de açúcares ou gorduras, podem ser aquecidas em estufas à vácuo, onde se reduz a pressão interna, assim aumenta a pressão de vapor da água, e como consequência reduz o ponto de ebulição da água. Assim, a água presente no alimento pode ser removida em temperaturas mais baixas (em torno de 70 °C).

Materiais

Cápsula de alumínio ou pesa-filtro, pinça, espátula, balança analítica, estufa à vácuo, dessecador.

Procedimento

1. Colocar a cápsula de alumínio (ou pesa-filtro) limpa em estufa a 105 °C por 1 hora, resfriar em dessecador até temperatura ambiente, e pesar em balança analítica.

2. Pesar diretamente na cápsula cerca de 5 a 10 g de amostra previamente triturada e homogeneizada, colocar na estufa à vácuo a 70 °C / 20 pol^2, por 3-4 horas.

3. Remover da estufa, levar ao dessecador para resfriar, até atingir a temperatura ambiente, e após pesar.

4. Repetir as operações de aquecimento (por cerca de 1 hora) e resfriamento até peso constante (a diferença de peso não pode ser maior que 0,5 mg / g de amostra).

Cálculo

Realizar o mesmo cálculo efetuado na determinação de umidade em estufa comum.

5.2. TEOR DE CINZAS

O teor de cinzas em alimentos refere-se ao resíduo inorgânico, ou resíduo mineral fixo presente na amostra (sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, cobre, cloreto, alumínio, zinco, manganês, dentre outros compostos minerais) remanescente da queima da matéria orgânica em mufla a altas temperaturas (500-600 °C).

Em altas temperaturas a água e os compostos voláteis são evaporados, e as substâncias orgânicas são queimadas na presença de oxigênio do ar, formando dióxido de carbono e água, que também evaporam. A maioria dos minerais são convertidos em óxidos, sulfatos, fosfatos, cloretos e silicatos e permanecem na amostra carbonizada.

Alguns elementos como o Fe, Pb, Hg, Cu, Zn, Cr e Ni, podem ser parcialmente volatilizados por este método. Portanto, o resíduo obtido não representa, por vezes, a totalidade do material inorgânico presente na amostra, devido à redução ou volatilização de alguns sais (minerais) durante o aquecimento.

O conteúdo em cinzas representa uma aproximação do conteúdo total de minerais na amostra alimentícia, podendo, portanto, ser utilizado como uma medida geral da qualidade, e frequentemente é utilizado como critério na identificação de alimentos.

Os recipientes empregados para a determinação de cinzas nos alimentos são normalmente cadinhos, que podem ser de platina, porcelana, quartzo, aço inoxidável ou níquel, sendo o de porcelana o mais comum.

Antes da incineração em mufla, as amostras sólidas devem ser cuidadosamente carbonizadas (em bico de Bunsen, chapas de aquecimento ou em estufas) para ocorrer a remoção da água, e assim evitar respingos ou queima da amostra na mufla. Este procedimento deve ser sempre realizado em capela de exaustão (exceto para estufas) devido aos gases liberados no aquecimento. Para facilitar a carbonização inicial da amostra podem ser adicionadas algumas gotas de azeite comestível, pois o azeite não contém cinzas, e evita a formação de espumas.

A temperatura de carbonização é importante na determinação de cinzas, porque em temperaturas acima de 600 ^{0}C pode ocorrer uma perda considerável de cloretos na amostra; no entanto, em temperaturas inferiores a 525 °C pode resultar na queima inadequada da amostra. Ao final da análise de cinzas, observa-se um resíduo de cinzas brancas ou de cor cinza (algumas esverdeadas ou avermelhadas), indicando que todo o

carbono foi eliminado. Se as cinzas não ficarem esbranquiçadas, pode-se adicionar algumas gotas de água, evaporando-se e calcinando-se novamente.

Materiais

Cadinho de porcelana, pinça, balança analítica, mufla, bico de Bunsen, estufa, dessecador.

Procedimento

1. Colocar a cápsula de porcelana em mufla a 550 °C / 1 hora, esfriar em dessecador até temperatura ambiente, e pesar em balança analítica.

2. Pesar cerca de 2,5 g de amostra previamente triturada e homogeneizada, e carbonizar a amostra em temperatura baixa, em bico de Bunsen ou similar.

3. Incinerar em mufla a 550 °C por 3-4 horas (observar até que a cinza apresente coloração cinza-claro), esfriar em dessecador até temperatura ambiente e pesar.

4. Repetir as operações de aquecimento (por cerca de 1 hora) e resfriamento, até peso constante.

Obs.: Caso a amostra não forme cinzas claras, adicionar 1-2 gotas de água (ou ácido sulfúrico), e retornar à mufla pelo menos por 2 horas.

Cálculo

Expressar os resultados em cinzas % (m/m), pela diferença de peso entre a quantidade de amostra úmida e o conteúdo de cinzas.

Exemplo

Ao determinar o conteúdo de cinzas em uma pasta de abóbora, tinha como peso de amostra úmida 3,2367 g e após a incineração restou 0,3485 g de cinzas (descontando o peso da cápsula). Assim, o teor de cinzas % (m/m) em b.u. seria de 10,77% (0,3485 g x 100 / 3,2367 g).

5.3. FIBRAS

O termo fibras engloba as diversas substâncias que compõem as paredes celulares das plantas (celulose, hemicelulose, pectina), de substâncias que não compõem as paredes celulares (hidrocolóides como as mucilagens e gomas) e da lignina (polímero que não é carboidrato).

5.3.1. FIBRA BRUTA

O termo fibra bruto ou fibra dietética, teoricamente incluem materiais que não são digeríveis pelas enzimas presentes no organismo humano (enzimas proteolíticas e diastásicas), e são insolúveis em ácidos e bases diluídas em condições específicas, não sendo utilizados no trato digestivo de animais, exceto por fermentação microbiana. A fibra dietética não tem valor nutritivo para o ser humano, por não ser degradada pelas enzimas digestivas, mas auxilia nos movimentos peristálticos do intestino.

A determinação da fibra bruta consiste na perda na incineração do resíduo seco remanescente, após digestão da amostra com soluções de ácido sulfúrico e de hidróxido de sódio, sob condições específicas.

A amostra deve ser previamente desengordurada quando possuir quantidades de gordura superior a 10% (m/m), pois o teor de gordura pode superestimar a quantidade de fibras no alimento. Além da gordura, deve-se assegurar que todo o amido seja removido da amostra, pois sua permanência também superestimar o conteúdo de fibras.

Na determinação da fibra bruta, parte da hemicelulose, pectina e hidrocolóides são solubilizadas e perdidas, portanto, não são contabilizados na fração fibra.

Materiais e reagentes

Estufa, forno mufla, balança analítica, sistema de sucção à vácuo, dessecador, béquer de 600 mL, funil de Büchner, cadinho de vidro sinterizado com porosidade 1 (90 a 150 µ), tela de nylon 198 mesh ou poliéster, condensador de refluxo, antiespumante (silicone ou álcool n-amílico), éter etílico p.a, acetona p.a, solução de ácido sulfúrico a 1,25% v/v (0,255 N), solução de hidróxido de sódio 1,25% m/v (0,313 N).

Procedimento

1. Pesar cerca de 1-2 g de amostra segundo o teor de fibra bruta estimada.

2. Secar, desengordurar (se o teor de gordura for maior que 5%) com 4 porções de 20 mL de éter etílico, secar novamente em estufa a 105 ^{0}C / 1 h.

3. Transferir o resíduo para um béquer de 600 mL, adicionar 200 mL de solução de ácido sulfúrico 1,25% em ebulição e algumas gotas de solução antiespumante.

4. Digerir em refluxo por exatamente 30 minutos, após filtrar com tela de nylon ou poliéster. Lavar o resíduo com água destilada fervente (± 200 mL) até completa neutralização.

5. Passar todo o resíduo para o béquer utilizado anteriormente. Lavar a tela com 200 mL de NaOH 1,25% (0,313 N) em ebulição e adicionar algumas gotas de solução antiespumante.

6. Digerir em refluxo por exatamente 30 minutos, filtrar diretamente em cadinho de vidro sinterizado, utilizando água destilada quente para a filtração.

7. Lavar o cadinho com aproximadamente 20 mL de álcool etílico (remove resíduos hidrossolúveis) e 20 mL de acetona (remove resíduos lipossolúveis), colocar em estufa a 105 ^{0}C até peso constante (4–5 h), retirar, deixar esfriar em dessecador até temperatura ambiente e pesar.

8. Carbonizar em mufla a 550 ^{0}C por 3-4 h, após retirar o cadinho, colocar no dessecador, deixar esfriar até a temperatura ambiente e pesar.

9. Repetir as operações de aquecimento (por cerca de 1 hora) e resfriamento, até peso constante.

Cálculo

Calcular o teor de Fibra bruta % (m/m), em relação a massa de amostra inicial, levando em consideração a massa de amostra após a secagem (fibras + minerais), e a amostra restante após a carbonização (minerais).

Exemplo

Pesando 2,3893 g de amostra, após as digestões ácida e alcalina e após secagem em estufa restou 0,3724 g de amostra (fibras + minerais), e depois da calcinação restou 0,1758 g de amostra (minerais). Assim, o teor de fibras é 0,3724 g – 0,1758 g = 0,1966 g.

Teor de fibras % m/m (b.u.) = (0,1966 g x 100) / 2,3893 g = 8,23 % m/m (b.u.)

5.3.2. FIBRA ALIMENTAR

Segundo a legislação brasileira, a fração de fibra alimentar é constituída por polímeros de carboidratos com três ou mais unidades monoméricas que não são hidrolisadas pelas enzimas endógenas do trato digestivo humano.

A determinação fundamenta-se na ação sucessiva, em amostras secas e desengorduradas, de enzimas digestivas: alfa-amilases, amiloglucosidades e proteases. Ao final do processo, após a incineração das alíquotas, calcula-se a quantidade de fibra descontando o peso de proteínas e cinzas na amostra.

A partir deste método consegue-se determinar o conteúdo total de fibras nos alimentos, incluindo as fibras solúveis e insolúveis.

Materiais e reagentes

Acetona p.a., celite (terra diatomácea) lavada com ácido, balança analítica, mufla, estufa, dessecador, béquer de 400 mL ou 600 mL de forma alta, MÊS- ácido 2-(n-morpholino) ethanosulfonico, TRIS- tris (hidroximetil) aminometano, solução tampão MÊS-TRIS, agitador magnético, protease, solução de alfa-amilase termo estável, banho maria com agitação, solução de ácido clorídrico 0,561 N, solução de amiloglucosidade, álcool etílico a 95%, funil de Büchner, cadinho de vidro sinterizado, porosidade ASTM de 40 a 60 µm, Pyrex de 60 mL, álcool etílico a 78%.

Procedimento

Preparo dos cadinhos de filtração: incinerar por 12 horas a 525 ^{0}C, em mufla; remover da mufla quando a temperatura reduzir a 130 ^{0}C. Molhar o cadinho por 1 hora em solução de limpeza a 2% após lavar com água deionizada e enxaguar com 15 mL de acetona, secar. Adicionar cerca de 1,0 g de celite aos cadinhos, secar em estufa a 130 ^{0}C até peso constante, esfriar em dessecador e anotar o peso dos cadinhos com celite.

Obs. Devem ser preparados doze (12) cadinhos, quatro deles para utilizar na determinação da fibra alimentar total (dois para as amostras e dois para os brancos), quatro para a determinação da fibra alimentar insolúvel (dois para as amostras e dois para os brancos), e quatro para a determinação da fibra alimentar solúvel (dois para as amostras e dois para os brancos).

Amostras: É necessário realizar o procedimento com duas amostras (e paralelamente com dois brancos), onde uma das amostras será utilizada para a determinação da fibra alimentar total, e a outra amostra será utilizada para a determinação da fibra alimentar insolúvel. Dependendo do teor de umidade, gordura e açúcares, deve-se remover previamente estes compostos, visando facilitar a eficiência do tratamento enzimático. Alimentos com altos teores de umidade devem ser inicialmente secos em estufa à vácuo a 70 ^{0}C por 3-4 h, e calcular o teor de umidade. Alimentos com altos teores de açúcares devem ser tratados previamente com 100 mL de álcool a 85% por 30 minutos em banho-maria a 70 ^{0}C com posterior filtração, lavando resíduo com álcool a 70%. Alimentos com altos teores de lipídios (acima de 10%), devem ser

desengordurados com éter etílico, em aparelho de Soxhlet, quantificando-se o teor de gordura. Após o tratamento adequado, a amostra deve ser moída ou triturada.

1. Pesar 1,0 g (±0,005) de amostra (preparar duas amostras e paralelamente dois brancos) em béquer de 400 mL, adicionar 40 mL de solução tampão MES-TRIS (pH 8,2) e agitar com agitador magnético até completa dispersão da amostra na solução, para prevenir a formação de grumos, que torna a amostra inacessível às enzimas.

2. **Incubação com alfa-amilase termoestável:** Adicionar 50 µL de alfa-amilase termoestável, com agitação lenta, cobrir o béquer com papel alumínio, levar ao banho-maria com agitação a 95-100 ^{0}C, e incubar por 35 minutos com agitação contínua. Remover o béquer com a amostra, resfriar até 60 ^{0}C, remover o papel alumínio e com auxílio de uma espátula, remover qualquer material aderido às paredes do béquer, após lavar as paredes laterais do béquer com 10 mL de água destilada.

3. **Incubação com protease:** Adicionar 100 µL de protease na amostra, cobrir com papel alumínio e incubar em banho a 60 ^{0}C, com agitação contínua por 30 minutos (começar a contagem quando a temperatura do banho chegar em 60 ^{0}C). Remover o béquer do banho (remover o alumínio), adicionar 5 mL de solução de HCL 0,561 N na amostra (com agitação), ajustar o pH a 4,1-4,8 (se necessário) com solução de NaOH 5% ou HCI 5%.

4. **Incubação com amiloglicosidase:** Adicionar 200 µL de amiloglicosidase sob agitação, colocar o papel alumínio e incubar em banho maria a 60 ^{0}C por 30 minutos, com agitação constante (começar a contagem quando a temperatura do banho chegar em 60 ^{0}C).

FIBRA ALIMENTAR TOTAL

1. Utilizar uma das amostras obtidas na etapa inicial com o uso de enzimas (e um branco), adicionar 225 mL de etanol a 95% pré-aquecido a 60 ^{0}C (medir o volume após aquecimento (a razão volume de etanol / volume de amostra, deve ser 4:1, v/v), cobrir com papel alumínio, e deixar precipitar em temperatura ambiente por 1 hora.

2. Utilizar dois dos cadinhos que foram previamente preparados para filtrar os precipitados da amostra (e dois para os brancos), usando frasco de lavagem com etanol a 78% e espátula, transferindo quantitativamente todas as partículas para os cadinhos, lavar os resíduos com duas porções sucessivas de 15 mL de etanol a 78%, etanol a 95% e acetona, após secar os cadinhos contendo os resíduos em estufa a 105 ^{0}C, por 12 horas, esfriar em dessecador (20 minutos) e pesar.

3. Determinar o teor de cinzas (525 ^{0}C / 5 h) do resíduo de um dos cadinhos, e o teor de proteínas do resíduo do segundo cadinho.

Cálculo

Fibra alimentar total % (m/m) = [(Peso do resíduo da amostra – Peso do resíduo do branco) / peso de amostra] x 100

Onde,

Peso do resíduo da amostra = resíduo do cadinho da amostra – proteínas da amostra – cinzas da amostra.

Peso do resíduo do branco = resíduo do cadinho do branco – proteínas do branco – cinzas do branco.

Resíduo do cadinho = peso do cadinho com resíduo e celite – peso do cadinho seco com celite.

Exemplo

Peso de amostra = 0,9838 g, peso do cadinho com resíduo = 3,5732 g, peso do cadinho com celite = 3,4978 g, proteína da amostra = 0,0241 g, cinzas da amostra = 0,0019 g

Dados do branco: peso do cadinho com resíduo = 3,0111 g, peso do cadinho com celite = 3,0108 g, proteína do branco = 0,0000 g, cinzas do branco = 0,0001 g

Assim,

Peso de amostra = 0,9838 g

Resíduo do cadinho da amostra = (3,5752 g – 3,4980 g) = 0,0772 g

Peso de resíduo da amostra = 0,0772 g – 0,0241 g – 0,0019 g = 0,0512 g

Resíduo do cadinho do branco = (3,0111 g – 3,0108 g) = 0,0003 g

Peso de resíduo do branco = 0,0003 g – 0,0000 g – 0,0001 g = 0,0002 g

Fibra alimentar total % (m/m) = [(0,0512 g – 0,0002 g) / 0,9838 g] x 100 = 5,18% (m/m) b.u.

FIBRA ALIMENTAR INSOLÚVEL

1. Filtrar a outra amostra (e um branco) obtida pelas misturas enzimáticas em dois cadinhos previamente preparados em um béquer de 200 mL aplicando vácuo, após lavar o béquer e os resíduos com água destilada a 70 °C, juntar e transferir os filtrados para béquer de 600 mL, previamente tarado (guardar estes filtrados para posterior determinação de fibras solúveis).

2. Lavar os resíduos com 20 mL de etanol a 95% (para remover o açúcar), e com 20 mL de acetona (para remover a gordura), secar os cadinhos contendo os resíduos em estufa a 105 °C, por 12 horas, esfriar em dessecador (20 minutos) e pesar.

3. Determinar o teor de cinzas (525 °C / 5 h) do resíduo de um dos cadinhos, e o teor de proteínas do resíduo do outro cadinho.

Cálculo

Realizar o mesmo cálculo efetuado para o teor de fibra alimentar total, expressando em fibra alimentar insolúvel % (m/m).

FIBRA ALIMENTAR SOLÚVEL

1. Utilizar o filtrado obtido na determinação de fibras insolúveis (contido no béquer de 600 mL), pesar o béquer com os filtrados da amostra (e do branco), ajustar o peso dos filtrados para 80 g, adicionar 320 mL de etanol a 95%, pré-aquecido a 60 °C, e deixar formar o precipitado, em temperatura ambiente por 60 minutos.

2. Utilizar dois cadinhos que foram tarados inicialmente, filtrar os precipitados usando frasco de lavagem com etanol a 78% e espátula, transferindo quantitativamente

todo o material para os cadinhos, lavar os resíduos com duas porções sucessivas de 15 mL de etanol a 78%, etanol a 95% e acetona, após secar os cadinhos contendo os resíduos em estufa a 105 °C, por 12 horas, esfriar em dessecador (20 minutos) e pesar.

3. Determinar o teor de cinzas (525 °C/5 h) do resíduo de um dos cadinhos, e o teor de proteínas do resíduo do outro cadinho.

Cálculo

Realizar o mesmo cálculo efetuado para o teor de fibra alimentar total, expressando em fibra alimentar solúvel % (m/m).

5.4. TEOR DE GORDURA

Os lipídeos são definidos como componentes do alimento que são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. A determinação direta de lipídeos em alimentos é feita pela extração com solventes orgânicos de baixa polaridade (altas ou baixas temperaturas) como éter etílico, éter de petróleo, acetona, clorofórmio ou hexano, os quais são removidos no final do processo por evaporação. O resíduo obtido denomina-se extrato etéreo, por representar não somente o teor de lipídeos (ácidos graxos, triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, fosfolipídeos e glicolipídeos), mas também de vários compostos solúveis ou parcialmente solúveis no solvente orgânico, como pigmentos lipossolúveis (carotenóides, clorofilas), vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), esteróis, fosfatídeos, ceras, dentre outros, que são normalmente extraídos em pequena quantidade juntamente com a fração lipídica.

Em muitos alimentos, principalmente cereais e alimentos processados, parte dos lipídeos estão ligados às proteínas e carboidratos, o que dificulta sua remoção somente com solventes de baixa polaridade. Para estes alimentos, uma melhor avaliação do conteúdo total de lipídeos pode ser feita pela determinação do teor das substâncias solúveis em éter etílico, após tratamento prévio com ácido clorídrico para hidrolisar as ligações com compostos como proteínas e carboidratos, solubilizá-los em água e liberar os lipídeos.

5.4.1. MÉTODO DE SOXHLET

No método mais comum para a extração de gorduras utiliza-se o extrator de Soxhlet, o qual proporciona refluxo contínuo do solvente, que fica em contato com a amostra a temperaturas inferiores ao seu ponto de ebulição, assim evita a decomposição da amostra; no entanto, necessita longos períodos de extração. Este método fundamenta-se na determinação do teor de substâncias solúveis em éter de petróleo (hexano ou éter etílico), a través de um processo eminentemente gravimétrico, baseado na perda de peso do material submetido à extração, ou na quantidade de material dissolvido pelo solvente. A amostra deve conter baixo conteúdo de umidade (para facilitar a extração), e ser finamente dividida (aumentar a área de contato) para facilitar a penetração do solvente. A velocidade do refluxo deve ser controlada, para otimizar o contato do solvente com a amostra e evitar perdas por evaporação do solvente.

Materiais e reagentes

Extrator de Soxhlet, cartuchos desengordurados, algodão desengordurado, éter de petróleo, estufa, dessecador, balão de 250 mL.

Procedimento

1. Aquecer o balão de 250 mL em estufa a 105 ^{0}C / 1 h, esfriar em dessecador e pesar.

2. Pesar 5-10 g de amostra previamente triturada e homogeneizada, em papel de pesagem, transferir para o cartucho de extração previamente desengordurado, e colocar na parte superior do cartucho um chumaço de algodão (desengordurado) para evitar a saída da amostra (se necessário), e colocar o cartucho no extrator de Soxhlet.

Obs. se a amostra contiver mais de 10% de umidade, deve-se pesar e após deixar a amostra em estufa a 105 ^{0}C / 2 horas antes de colocar no cartucho de Soxhlet.

3. Colocar éter de petróleo no balão de destilação (cerca de 200 mL), e adaptar ao extrator de Soxhlet, após aquecer em refluxo por 6 horas (evitar aquecimento excessivo para não evaporar solvente pelo condensador).

4. Remover o solvente (recuperá-lo por destilação) da amostra, levar o balão à estufa a 105 ^{0}C / 1 h, resfriar em dessecador e pesar (repetir a operação até peso constante).

Obs. Uma vez pesado o balão de destilação, evitar pegar com as mãos o cartucho do extrator e o algodão, após estes serem desengordurados.

Cálculo

Calcular o % de Lipídios presentes na amostra, pela diferença de peso do balão antes e após a extração da gordura, levando em consideração o peso inicial da amostra.

Exemplo

Pesando inicialmente 8,3456 g de amostra, após a extração com solvente obteve-se 0,7458 g de gordura (pela diferença do peso do balão com a gordura – o peso do balão vazio).

Teor de gordura % m/m (b.u.) = (0,7458 g x 100) / 8,3456 g = 8,94 % m/m (b.u.)

5.4.2. MÉTODO DE BLIGH & DYER

Baseia-se na extração da gordura a frio, utilizando uma mistura de três solventes, clorofórmio, metanol e água.

A amostra é inicialmente triturada e após misturada com a solução de clorofórmio: metanol, deixando-se em agitação por um determinado período. Após isso, adiciona-se água, quando se forma duas fases, uma (clorofórmio) contendo a fração lipídica e a outra (metanol:água) contendo os demais constituintes. Pela evaporação do solvente se obtém a fração gordurosa. Esse método tem a vantagem de conservar os lipídeos insaturados e seus componentes minoritários, evitando reações degradativas devido a utilização de altas temperaturas.

Materiais e reagentes

Estufa, balança analítica, banho maria, dessecador, funil de separação, béquer, funil, clorofórmio, metanol, rota evaporador à vácuo.

Procedimento

1. Pesar em torno de 10 g de amostra triturada em béquer.

2. Adicionar uma mistura de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v), em quantidade equivalente a 10 mL da mistura por grama de amostra, e homogeneizar com frequência por cerca de 30 minutos.

3. Filtrar a mistura, recebendo o filtrado em funil de separação de 250 mL (se necessário pode-se centrifugar a amostra), lavar o material do filtro com 25 mL da mistura de solvente.

4. Adicionar água, na proporção de 0.8:1.0 (v/v) em relação a quantidade de metanol utilizado, agitar, deixar separar as fases (se necessário adicionar alguns mL de solução saturada de NaCl para romper a emulsão entre as fases).

5. Remover a fase orgânica (fase inferior) em béquer, transferir para o rotaevaporador à vácuo (o balão do evaporador deve ser previamente seco a 105 °C / 1h e pesado), em temperaturas inferiores a 50 °C até a evaporação de todo o solvente, pesar o frasco do evaporador com a fração lipídica.

Obs. Se for utilizar a fração lipídica para análises posteriores, redissolver a gordura com alguns mL de clorofórmio:metanol (3:1, v/v), transferir para frasco âmbar e congelar.

Cálculo

Efetuar o mesmo cálculo realizado na extração da gordura por Soxhlet.

5.4.3. MÉTODO DE MOJONNIER

Esse método é muito utilizado para a determinação de gordura em produtos lácteos, rações animais, farinhas gordurosas e em amostras de alto teor proteico e de açúcares. O método baseia-se na hidrólise ácida ou alcalina das ligações proteína-gordura e açúcar-gordura, seguida da separação da gordura e extração com solventes orgânicos.

Materiais e reagentes

Estufa, balança analítica, banho Maria, dessecador, frascos de Mojonnier, béqueres, éter de petróleo, éter etílico, álcool etílico a 95%, ácido clorídrico (25+11), algodão, funil.

Procedimento

1. Secar dois béqueres de 100 mL contendo pérolas de vidro a 100 ^{0}C por 30 minutos, esfriar a temperatura ambiente em dessecador e pesar.

2. Pesar 2 g de amostra previamente triturada e homogeneizada diretamente no frasco de extração de Mojonnier.

3. Adicionar 2 mL de álcool etílico (para prevenir a formação de grumos), agitar para homogeneizar o material, adicionar 10 mL de solução de ácido clorídrico (25+11), misturar, e levar em banho maria (70-80 °C / 30-40 minutos), agitando frequentemente (fazer em paralelo um branco).

4. Esfriar a temperatura ambiente e adicionar álcool etílico até que o nível do líquido atinja a parte estreita do tubo de Mojonnier, adicionar 25 mL de éter etílico, fechar com tampa de vidro ou Neoprene e agitar vigorosamente por 1 minuto, aliviando periodicamente a pressão.

5. Lavar com solvente a gordura aderida ao fundo da tampa, para dentro do frasco com éter de petróleo, adicionar 25 mL de éter de petróleo, fechar e agitar vigorosamente por 1 minuto, e após deixar em repouso até que o líquido superior esteja bem claro.

6. Filtrar a solução do éter com a gordura em béquer de 100 mL, previamente tarado.

7. Extrair novamente a gordura do líquido restante no frasco de Mojonnier por mais duas vezes, utilizando 15 mL de éter de petróleo seguido de 15 mL de éter etílico, agitando 1 minuto após cada adição de solvente, e filtrar para o béquer.

8. Lavar o frasco, a tampa e o funil com alguns mL da mistura dos dois éteres (1+1, v/v).

9. Evaporar lentamente em banho maria até a evaporação do solvente, então secar em estufa o material contido no béquer a 100 °C por 30 minutos, esfriar a temperatura ambiente em dessecador e pesar.

Cálculo

Efetuar o mesmo cálculo realizado pela extração por Soxhlet, descontando o valor do branco.

5.4.4. MÉTODO DE GERBER

Consiste em um método de rotina realizado para leite e produtos lácteos, onde a gordura se encontra na forma de emulsão do tipo óleo-água. Utiliza-se ácido sulfúrico para quebrar a emulsão, e álcool para facilitar a separação da gordura. Após a digestão (pelo ácido) da gordura e centrifugação, a gordura é medida volumétricamente diretamente no butirômetro.

Materiais e reagentes

Lactobutirômetro de Gerber, balança analítica, pipetas de 1 mL e 10 mL, pipetadores de 1 e 10 mL, termômetro, pipeta volumétrica de 11 mL, centrífuga de Gerber, banho-maria, ácido sulfúrico, álcool isoamílico.

Procedimento

1. Pipetar 10 mL de ácido sulfúrico para o butirômetro, adicionar lentamente com a pipeta volumétrica 11 mL da amostra, e adicionar 1 mL de álcool isoamílico.

2. Fechar o butirômetro, pesar, e agitar até completa dissolução, centrifugar a 1200 ± 100 rpm durante 5 minutos.

3. Deixar em banho-maria a 63 ± 2 °C, por 2-3 minutos, com a rolha para baixo, remover mantendo a posição invertida do butirômetro (rolha para baixo), ajustar a camada amarelo-clara correspondente à gordura, dentro da escala graduada do lactobutirômetro, anotar o valor.

Cálculo

O valor obtido na escala corresponde diretamente à porcentagem de gordura, cuja leitura deve ser feita no menisco inferior.

5.5. PROTEÍNAS

Proteínas são polímeros de aminoácidos ou compostos que contêm polímeros de aminoácidos, as quais exercem uma função nutricional, interferem na textura, e afetam as propriedades funcionais e sensoriais dos alimentos, estando frequentemente associadas nos alimentos com lipídeos e carboidratos.

Estes compostos são macromoléculas constituídas de cadeias com até centenas de aminoácidos, com cerca de 20 tipos diferentes de amino ácidos, que são unidos entre si por ligações peptídicas, formando assim cadeias de alto peso molecular.

Portanto, todas as proteínas são constituídas por aminoácidos, os quais contêm em sua estrutura grupamentos carboxílicos (COOH) e amínicos (NH_2), além de um radical (o qual diferencia os diferentes aminoácidos). Assim, a análise das proteínas pode ser realizada pela determinação de seus elementos, como o Carbono (C), nitrogênio (N), ou pelos grupos de aminoácidos ou ligações peptídicas.

A determinação mais comum de proteínas baseia-se no método de Kjeldahl, pelo qual se determina o conteúdo total de nitrogênio na amostra, e após se calcula indiretamente o conteúdo de proteína em função da quantidade de nitrogênio presente. O nitrogênio presente nas proteínas (em sua estrutura molecular) representa cerca de 16% de seu peso, apresentando pequenas variações em função do tipo de proteína, por isto utiliza-se como fator de conversão do nitrogênio em proteínas, valores aproximados a 6,25 (100 / 16).

Este método baseia-se em três etapas, incluindo:

Digestão: Fundamenta-se na digestão ácida do alimento em presença de catalisador, até que o carbono e hidrogênio sejam oxidados, em temperaturas que podem atingir 360 ^{0}C: Amostra-N + H_2SO_4 + $CuSO_4$ + K_2SO_4 → $(NH_4)_2SO4$.

Destilação: Consiste na reação do sulfato de amônio com uma base forte para liberar a amônia, a qual é recolhida em solução de ácido bórico, com a formação de um composto estável (borato de amônio) de coloração verde em indicador misto: $(NH_4)_2SO_4$ + NaOH → NH_3 + H_3BO_3 → $(NH_4)_3BO_3$.

Neste estágio é comum adicionar-se algum antiespumante, para evitar a formação de espuma pela presença de gordura, e pérolas de vidro para facilitar a homogeneização e desprendimento da amônia.

Titulação: O borato de amônio recolhido é titulado com ácido clorídrico, para determinar o amoníaco absorvido pelo ácido bórico (retorna à coloração rosa), ocorrendo a formação de cloreto de amônio e liberação do ácido bórico: $(NH_4)_3BO_3 + HCl \rightarrow NH_4Cl + H_3BO_3$.

Em função da variação do conteúdo de nitrogênio nas diferentes proteínas, foram estipulados fatores de conversão do nitrogênio em relação ao tipo de alimento analisado (RDC 359, 2020). Segundo a legislação brasileira (IN 75, 2020) estes valores são: para proteínas vegetais 5,75; proteínas lácteas 6,38; e proteínas de cárneos, de soja e de milho 6,25.

Materiais e reagentes

Balança analítica, conjunto Kjeldahl para digestão e destilação, bureta de 10 mL, frascos de semimicro Kjeldahl de 100 mL, erlemeyer de 250 ou 500 mL, pérolas de vidro, provetas de 100 mL, solução de ácido clorídrico 0,1 N, solução de hidróxido de sódio a 50%, sulfato de cobre, sulfato de potássio ou de sódio, hidróxido de potássio, solução de ácido sulfúrico concentrado, indicador misto, zinco metálico granulado, solução de ácido bórico a 4% (m/v).

Procedimento

1. Pesar cerca de 0,25 g de amostra e transferir para tubo de digestão de 100 mL, adicionar 3 g da mistura catalítica, e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado pelas paredes do frasco (proceder uma prova em branco).

2. Iniciar a digestão com temperatura baixa, elevar aos poucos de 50 em 50 ^{0}C, prosseguir elevando até o máximo de 380 ^{0}C, evitando deixar amostra aderida às paredes do frasco. Quando cessar a emissão de vapores e a solução ficar clara, continuar o aquecimento por mais 30 minutos.

3. Esfriar, adicionar 60 mL de água destilada, agitar até a dissolução total, colocar alguns grânulos de zinco e levar ao destilador.

4. Adaptar o terminal do condensador (do destilador) para que fique totalmente mergulhado em erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 mL de solução de ácido bórico a 4% (m/v) e 5-7 gotas de indicador misto.

5. Adicionar 50 mL de hidróxido de sódio a 50% (m/v) a través do destilador, e proceder a destilação até o volume do erlenmeyer atingir cerca de 100 mL.

6. Titular o destilado com ácido clorídrico 0,1 N em bureta de 10 mL, até a viragem do indicador, da coloração verde para o rosa.

Cálculo

A quantidade em equivalentes gramas de ácido clorídrico gasto na titulação corresponde a quantidade em equivalentes gramas de nitrogênio da amostra, que convertido com fator apropriado, de acordo com o tipo de alimento, corresponde ao teor de proteína bruta da amostra.

Conversão de nitrogênio para proteína: Para proteínas vegetais 5,75; proteínas lácteas 6,38; e proteínas de cárneos, de soja e de milho 6,25.

Exemplo

Na determinação de proteínas de um alimento com base em milho foi utilizado 2,4867 g de amostra, e na titulação gastou-se 4,7 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 N (f= 1,0023) para a amostra, e de 0,2 mL para o branco.

O volume gasto foi de (4,7 mL – 0,2 mL) 4,5 mL, e a normalidade corrigida do ácido de (0,1 N x 1,0023) 0,10023 N. Então, a quantidade em equivalentes gramas de ácido clorídrico gasto foi de 0,00045 eqg (0,10023 eqg x 4,5 mL) / 1000 mL). Assim, a quantidade em equivalentes gramas de nitrogênio presentes na amostra é o mesmo, ou seja, 0,00045 eqg. Convertendo para gramas, se tem 0,0063 g (0,00045 eqg x 14 g) / 1 eqg). Portanto, calculando em 100 g de amostra se tem 0,2533 g de N em 100 g de amostra (0,0063 g x 100 / 2,4867 g). Convertendo o teor de nitrogênio em proteínas, esse valor corresponde a1,58 % (m/m) (0,2533 g x 6,25) em b.u.

Também se pode utilizar a fórmula

Proteína bruta % (m/m) = [100 x 0,014 x F x (Va - Vb) x f x N] / P

Onde, P = gramas de amostra, F = fator de conversão de nitrogênio em proteína, Va = volume de ácido clorídrico gasto na titulação, Vb = volume de ácido clorídrico gasto na prova em branco, f = fator de correção da solução de ácido clorídrico, e N = normalidade da solução de ácido clorídrico.

5.6. CARBOIDRATOS

Carboidratos compreendem todos os monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos presentes no alimento, incluindo os polióis, que são digeridos, absorvidos e metabolizados pelo ser humano.

Os carboidratos podem ser encontrados como moléculas simples (monossacarídeos) ou agregados por ligações glicosídicas, formando polímeros de duas a dez unidades (oligossacarídeos) ou polímeros de mais de dez unidades (polissacarídeos). Os monossacarídeos podem ser encontrados sob a forma de aldoses e cetoses, sendo subdivididas dependendo do número de carbonos na cadeia em trioses, tetroses, pentoses, hexoses e heptoses. Dentre os oligossacarídeos, podem ser encontrados nos vegetais os dissacarídeos (sacarose, maltose e celobiose), trissacarídeos (rafinose) e tetrassacarídeos (estaquiose). Os polissacarídeos são macromoléculas de alto peso molecular, unidas por ligações glicosídicas, as quais formam cadeias lineares e ramificadas. À medida que aumenta o tamanho da cadeia destes compostos, sua solubilidade em meio aquoso vai diminuindo. Os polissacarídeos que possuem a capacidade de agregar uma grande quantidade de água, formando soluções coloidais, são denominados de gomas, hidrocolóides ou mucilagens. Os principais polissacarídeos presentes nos vegetais são o amido, celulose e substâncias pécticas.

O conteúdo total de carboidratos é determinado através do cálculo de diferença entre os principais constituintes (em peso) dos alimentos (macroelementos). Este cálculo fornece uma ideia do conteúdo total de carboidratos presente na amostra, sem diferenciar sua disponibilidade no alimento.

A importância em sua determinação nos alimentos, baseia-se em suas funções, principalmente nutricional como fonte de energia, como adoçante natural, fonte fermentescível, e em suas propriedades funcionais (textura, géis) e químicas (como reações de escurecimento).

Cálculo

O conteúdo total de carboidratos se determina por diferença de 100 e o percentual dos macronutrientes presentes no alimento calculados em base úmida.

Total de CH % (m/m) = 100 – (% umidade + % gordura + % proteínas + % fibras + % de cinzas).

Exemplo

Na análise de um alimento se obteve: 3,50% de proteínas, 2,30% de gordura, 76,91% de umidade, 1,22% de cinzas e 2,53% de fibras.

O total de carboidratos % (m/m) corresponde a: 100 - (76,91 + 2,30 + 3,50 + 2,53 + 1,22) = 13,54%.

5.7. VALOR ENERGETICO

O valor energético ou calórico (kcal/g) deve corresponder a soma do valor energético metabolizável de cada constituinte do alimento. Segundo a legislação brasileira (RDC n^0 429 de 2020; IN 75 de 2020), deve-se considerar: Carboidratos (exceto polióis) 4 kcal/g; Proteínas 4 kcal/g; Gorduras 9 kcal/g; Álcool (etanol) 7 kcal/g; Ácidos orgânicos 3 kcal/g; Lactititol 3 kcal/g; Xilitol 2,4 kcal/g; Maltitol 2,1 kcal/g; Sorbitol 2,6 kcal/g; Manitol 1,6 kcal/g; Eritritol 0 kcal/g; Isomalte 2 kcal/g; Tagatose 3 kcal/g; Fibras alimentares solúveis, exceto polidextrose 2 kcal/g e Polidextrose 1 kcal/g.

Cálculo

O valor energético (ou calórico) % em kcal/g corresponde a soma dos nutrientes presentes no alimento, e elencados na RDC 429 e IN 75 (2020), multiplicando-se pelos respectivos valores energéticos calculados em base úmida.

Exemplo

Na análise de um alimento se obteve: 3,50% de proteínas, 2,30% de gordura, 76,91% de umidade, 1,22% de cinzas, 2,53% de fibras, 13,54% de CH e 0,25% de etanol.

O valor energético seria: (3,50 x 4) + (2,30 x 9) + (13,54 x 4) + (0,25 x 7) = 90,61 kcal/g, que arredondando segundo a legislação vigente (IN 75/2020) seria = 91 kcal/g.

CAPÍTULO

06 Análises gerais em alimentos

6.1. DETERMINAÇÃO DA IDENTIDADE E QUALIDADE DA GORDURA

6.1.1. DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL

O colesterol é uma substância encontrada na membrana celular de toda célula animal, sendo necessária para sua existência. O colesterol é definido como o esterol que apresenta um núcleo ciclopentanoperidrofenantreno com um grupo hidroxila no C-3 e uma cadeia carbônica no C-17.

A determinação do teor de colesterol em alimentos é muito importante, sua quantificação se baseia no método colorimétrico, onde a amostra passa por uma extração da gordura (quando necessário) e subsequente saponificação, sendo o colesterol extraído da fração insaponificável, e quantificado em colorímetro. Outros métodos utilizam-se de processos cromatográficos, através de cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia gasosa.

Materiais e reagentes

Banho maria, funil de separação, espectrofotômetro, ácido acético glacial, ácido sulfúrico, álcool etílico, anidrido acético, clorofórmio, colesterol p.a., éter etílico, fenolftaleína 1% (m/v), solução alcoólica de KOH 1,5 N, erlenmeyer de 250 mL.

Procedimento

1. Extrair a gordura da amostra, quando necessário (como para carnes, peixes, massas e alimentos sólidos em geral), pelo método de Soxhlet ou Bligh-Dyer (não há necessidade de extração quando se utiliza produtos como margarinas, manteiga, gordura de origem animal, ovos, leite).

2. Realizar a saponificação da amostra, pesando 2,0-2,5 g de amostra em erlenmeyer de 250 mL, adicionar 25 mL de solução de KOH alcóolico 1,5 N, homogeneizar periodicamente por 1 hora, e deixar em repouso no escuro por 18 horas.

3. Após transferir para funil de separação, lavando o frasco com 50 mL de água e 50 mL de éter etílico, tampar, agitar, deixar em repouso até separação das fases, transferindo a fase inferior para outro funil.

4. Lavar a fase aquosa (inferior) com 50 mL de éter, e lavar a fase etérea (superior) com 50 mL de água; agitar, separar as fases novamente.

5. Transferir as fases etéreas para recipiente previamente tarado, evaporar até reduzir a fase líquida, adicionar 3 mL de acetona, evaporar até secar (abaixo de 60 ^{0}C), esfriar, pesar.

6. Dissolver o resíduo com clorofórmio, transferindo para balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com clorofórmio.

7. Pegar 2 mL do resíduo em clorofórmio, e colocar em proveta de 25 mL com rolha esmerilhada, adicionar 1 mL de ácido acético glacial, mais 2 mL de anidrido acético, mais 0,2 mL de ácido sulfúrico concentrado, completar o volume a 20 mL com clorofórmio, e tampar a proveta.

8. Agitar, deixar em repouso em lugar escuro por 25 minutos, e realizar a leitura em espectrofotômetro a 625 nm.

9. Fazer um branco, realizando o mesmo procedimento, mas sem adicionar amostra.

Obs. Zerar o aparelho com clorofórmio.

Cálculo

Determinar o conteúdo de colesterol baseado na curva padrão de colesterol elaborada em mg/mL. Plotar um gráfico de concentração em mg de colesterol (eixo x) versus absorbância (eixo y), e traçar a equação de regressão da curva (ex. y = ax + b). Tendo o valor da absorbância da amostra, pela equação encontra-se a respectiva concentração de colesterol, expressando os resultados em mg de colesterol.100 g^{-1} de amostra.

Exemplo

Tendo a equação de regressão linear simples do padrão de colesterol: y = 1,5067 x + 0,417 expressa em mg / mL. Ao fazer a leitura da amostra encontrou-se a absorbância de 0,526 (considerando o branco zero), então a concentração é de 0,0723 mg / mL de colesterol (0,526 - 0,417 / 1,5067). Inicialmente se utilizou 2,4721 g de amostra, completou-se o volume de 50 mL, e destes foram retirados 2 mL. Nestes 2 mL contêm 0,0989 g (2,4721 g x 2 mL / 50 mL) de amostra. Portanto, se tem 1,8075 mg (0,0723 x 25 mL / 1 mL) de colesterol nos 25 mL da solução reagente, a qual contêm 0,0989 g de amostra. Em 100 g de amostra teria 1827,60 mg (1,8075 mg x 100 g / 0,0989 g) de colesterol por 100 g de amostra.

6.1.2. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos podem se apresentar com cadeias saturadas ou insaturadas, nas formas geométricas cis e trans, normalmente em cadeias entre 4 a 26 átomos de carbono, sendo os mais comuns com cadeias pares com 12 a 18 átomos de carbono. Na natureza os ácidos graxos apresentam-se essencialmente na forma esterificada ao glicerol, principalmente como triacilgliceróis, com pequenas quantidades de diacilgliceróis e monoacilgliceróis e de ácidos graxos livres. A composição relativa consiste na determinação proporcional dos ácidos graxos presentes na gordura.

Segundo a legislação brasileira, as gorduras monoinsaturadas são constituídas por triglicerídeos que contêm ácidos graxos com uma dupla ligação cis, expressos em ácidos graxos livres. As gorduras poli-insaturadas são constituídas por triglicerídeos que contêm ácidos graxos com duplas ligações cis-cis separadas por grupo metileno, expressos como ácidos graxos livres. As gorduras trans são constituídas por triglicerídeos que contêm ácidos graxos insaturados com uma ou mais duplas ligações não conjugadas na configuração trans, expressos como ácidos graxos livres, e as gorduras saturadas são constituídas por triglicerídeos que contêm ácidos graxos com apenas ligações simples.

Ácidos graxos saturados são muito comuns na natureza, apresentando-se em menores proporções em tecidos de origem vegetal e em maiores proporções em tecidos de origem animal (exceto em peixes e animais marinhos).

Os ácidos graxos insaturados apresentam-se em maiores proporções nos tecidos de origem vegetal, peixes e animais marinhos. Podem ocorrer diversos graus de insaturações, mas uma dupla, duas duplas e três duplas ligações são as mais comuns nos alimentos naturais. Quanto maior o número de insaturações na cadeia, maior é o benefício nutricional, mas maior é a instabilidade da gordura, devido a facilidade de ocorrer processos oxidativos.

A nomenclatura usual usa o número 1 para o carbono da carboxila; no entanto, nutricionalmente usa-se muito o termo ômega (w), seguindo a nomenclatura que localiza a insaturação pelo terminal metílico para indicar a posição da dupla ligação. Os ácidos graxos ômega 3 (w^3) são os ácidos graxos poli-insaturados nos quais a primeira dupla ligação se encontra no terceiro carbono a partir do grupo metil (CH_3) do ácido graxo; ômega 6 (W^6) são os ácidos graxos poli-insaturados nos quais a primeira dupla ligação se encontra no sexto carbono a partir do grupo metil (CH_3) do ácido graxo; e ômega 9 (W^9) são os ácidos graxos monoinsaturados nos quais a primeira dupla ligação se encontra no nono carbono a partir do grupo metil (CH_3) do ácido graxo. Assim tem-se, como exemplo os ácidos oléico ($C18:1\Delta^9$) e ácido eicosatrienóico ($C20:3\Delta^{5,8,11}$) como w^9, ácidos linoleico ($C18:2\Delta^{9,12}$) e γ-linolênico ($C18:3\Delta^{6,9,12}$) como w^6, e os ácidos α-linolênico ($C18:3\Delta^{9,12,15}$), ácido eicosapentaenóico ($C20:5\Delta^{5,8,11,14,17}$) e o ácido docosahexaenóico ($C22:6\Delta^{4,7,10,13,16,19}$) como w^3.

Materiais e reagentes

Tubos de ensaio com tampa, éter de petróleo, ácido clorídrico 0,5 N em metanol, isooctano, vial, pipeta de plástico, vortex, estufa, cromatógrafo gasoso com detector FID.

Procedimento

1. Pesar aproximadamente 100 mg de óleo em tubo de ensaio com tampa.

2. Dissolver o óleo em 1 mL de éter de petróleo, adiciona-se 12 mL de solução de HCl 0,5 N em metanol, misturar em vortex (pode-se colocar um padrão interno, como 1 mg de ácido heptadecanóico) e colocar em aquecimento em estufa a 65 °C por uma hora (até que a solução fique transparente).

3. Resfriar à temperatura ambiente e adicionar 5 mL de isooctano e 6 mL de água destilada, seguida por uma mistura vigorosa.

4. Esperar até que a parte da fase superior esteja clara, então transferir parcialmente a camada superior para um vial de 1,5 mL.

5. Injetar cerca de 1,5 µL de amostra no cromatógrafo gasoso.

Condições cromatográficas

Utiliza-se colunas polares de 30 a 100m, com um gradiente de temperatura, com a temperatura inicial da coluna de 100 °C, mantida por 0,5 min; após passa-se para 150 °C com incremento linear de 8 °C min^{-1}, mantida por 0,5 min; seguindo a 180 °C com incremento linear de 1,5 °C min^{-1}, mantida por 5 min; e finalmente a 220 °C com incremento linear de 2 °C min^{-1}, mantida por 6 min. O injetor e o detector FID são mantidos à temperatura de 250 °C. Utiliza-se o nitrogênio ou hidrogênio como gás de arraste a 1.0 $mL.m^{-1}$.

Identificação

A identificação se faz em comparação com uma mistura padrão contendo os diferentes ácidos graxos (FAME), e a quantificação relativa se faz em função da área proporcional de cada ácido graxo presente, expressando os resultados em % de cada ácido graxo, % de ácidos graxos saturados, % de ácidos graxos insaturados e % de ácidos graxos trans.

Quantificação

A quantificação se faz em relação a quantidade do padrão interno adicionado, relacionando-se a área do cromatograma do padrão interno, com a área dos demais ácidos graxos identificados.

6.1.3. ÍNDICE DE IODO

O índice de iodo é uma medida do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes em um óleo ou gordura, baseados na reatividade dos carbonos com duplas ligações com halogênios, principalmente com o iodo, onde ocorre reação de adição.

Quanto maior o número de duplas ligações, mais reações de adição ocorrerão, e, portanto, maior será o índice de iodo. Assim, gorduras insaturadas apresentam maior índice de iodo quando comparado com gorduras com menor grau de insaturações. Como a constituição de ácidos graxos de um determinado óleo ou gordura é fixo, o índice de iodo é característico para determinado óleo ou gordura. Inicialmente a solução de Wijs reage com a amostra insaturada [I-Cl (solução Wijs) + amostra → R- CHI-CHCl-R'], após o excesso da solução de Wijs reage com o iodeto de potássio (KI) liberando o iodo (I-Cl + 2KI → KCl + I_2), e finalmente, o iodo liberado é quantificado com o tiossulfato (I_2 + 2 $Na_2S_2O_3$ → 2NaI + $Na_2S_2O_4$). Se faz uma amostra em branco, a qual deve resultar em um maior gasto de tiossulfato pois não terá ácidos graxos insaturados para reagir com a solução de Wijs, assim vai liberar mais iodo e, portanto, irá gastar um volume maior de solução de tiossulfato.

Materiais e reagentes

Vidro de relógio, provetas de 10 e 100 mL, pipetas de 20 e 25 mL, bureta de 25 mL, erlenmeyer de 500 mL com rolha esmerilhada, solução de iodeto de potássio a 15% (m/v), solução de tiossulfato de sódio a 0,1 N, solução amido a 0,5% (m/v), tetracloreto de carbono ou ciclohexano, solução de Wijs.

Procedimento

1. Pesar cerca de 0,30 g de amostra, filtrar em papel filtro em erlenmeyer, adicionar 20 mL de ciclohexano, homogeneizar.

2. Adicionar com pipeta volumétrica, 25 mL de solução de Wijs, agitar lentamente, deixar em repouso por 30 minutos na ausência de luz.

3. Adicionar 20 mL de solução de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água fervida e fria.

4. Titular com solução de tiossulfato de sódio 0,1 N, até coloração amarela fraca; adicionar 1-2 mL de solução de amido, e titular até perder a coloração azul.

5. Fazer uma amostra em branco.

Cálculo

O cálculo se baseia na diferença da quantidade de equivalentes gramas de tiossulfato gastos na titulação com a amostra em branco e com a amostra com a gordura, que corresponde a quantidade de equivalentes gramas do iodo que reagiu com a amostra, expressando o resultado em g iodo.100 g^{-1} amostra.

Exemplo

Ao titular 0,35 g de uma gordura gastou-se 24,5 mL de tiossulfato de sódio 0,1 N (fc = 0,9865) (o branco foi zero). Assim, a quantidade de tiossulfato em equivalentes gramas gastos foram 0,002417 (0,09865 eqg x 24,5 mL / 1000 mL) eqg. Portanto, havia na amostra 0,002417 eqg de iodo. Expressando em gramas de iodo se obtém 0,3067 g (0,002417 eg x 126,90 g / 1 eqg). Calculando em % se obtém 87,63 $mg.100^{-1}$ g (0,3067 g x 100 / 0,35 g), o que corresponde ao índice de iodo.

Também se pode utilizar a fórmula

Índice de iodo (g / 100g) = [(B-A) x f x 1,27] / gramas de amostra

Onde: A = mL de solução de tiossulfato gasto com a amostra, B = mL de solução de tiossulfato gasto com o branco, e f = fator da solução de tiossulfato de sódio.

6.1.4. ÍNDICE DE ACIDEZ (IA)

Consiste na determinação de ácidos graxos livres presentes no meio devido a hidrólise química ou enzimática que ocorre nos triacilgliceróis. A presença de ácidos graxos livres nos óleos e gorduras é um índice de qualidade, pois na forma natural de óleos e gorduras, assim como em óleos comestíveis desodorizados, a quantidade de ácidos graxos livres é praticamente zero.

Os ácidos graxos podem estar na forma livre devido a hidrólise de triacilglicerídeos pela ação de enzimas (lipases), ou pela degradação química que ocorre durante o processamento ou preparo para consumo.

O índice de acidez é um termo específico relacionado com a acidez de um óleo ou gordura, o qual é definido como o número de miligramas de KOH necessários para neutralizar os ácidos graxos livres de 1 g de amostra.

Materiais e reagentes

Erlenmeyer de 125 mL, bureta de 25 mL, solução neutra de éter etílico:álcool etílico (2+1, v/v), fenolftaleína 1% (m/v), solução KOH alcóolico 0,1 N.

Procedimento

1. Colocar cerca de 2 g de amostra em erlenmeyer de 125 mL, adicionar 25 mL de solução de éter etílico:álcool etílico (2+1, v/v), agitar.

2. Adicionar 2 gotas de fenolftaleína e titular com solução de KOH alcóolico 0,1 N até coloração rósea.

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas de base gastos na titulação, que corresponde a quantidade de equivalentes gramas do ácido presente na amostra, expressando o resultado em mg KOH / g de amostra.

Exemplo

Se ao titular 2,5 g de uma gordura gastou-se 1,3 mL de solução de KOH 0,1 N (fc = 0,9897), o índice de acidez será:

Corrigindo a concentração da base se obtém 0,09817 N (0,1 N x 0,9817), assim, pelo conceito de normalidade se tem 0,09817 eqg de KOH em 1000 mL de solução.

Como gastou-se 1,3 mL na titulação, neste volume contém 0,0001276 eqg (1,3 mL x 0,09817 eqg / 1000 mL) de KOH. Convertendo para gramas, se tem 0,007160 g (0,0001276 eqg x 56,1 g / 1 eqg) de KOH, ou seja, 7,16 mg de KOH em 2,5 g de amostra. Calculando por g de amostra se obtém 2,86 mg (7,16 g x 1 g / 2,5 g) de KOH / g de amostra, que corresponde ao índice de acidez.

Também pode ser calculado utilizando a fórmula

Índice de Acidez (mg KOH / g amostra)= (Volume KOH x N x f x 56,1) / g amostra

Onde, N = normalidade da solução de KOH, e f = fator de correção da solução de KOH.

6.1.5. ÍNDICE DE PERÓXIDOS (IP)

Os peróxidos são produtos primários, ou seja, os primeiros produtos que se formam na oxidação de óleos e gorduras, e, portanto, expressam o grau de deterioração de um produto gorduroso. Em óleos recentes ou desodorizados o IP apresenta-se em valores próximos a zero. No entanto, deve-se ter cautela na análise deste resultado porque os peróxidos são instáveis e, assim que se formam podem se decompor facilmente em vários outros compostos. Assim, para se avaliar o grau de oxidação de uma gordura, deve-se determinar o índice de peróxidos, que mede os produtos primários da oxidação lipídica (peróxidos e hidroperóxidos), além de outra técnica para determinar os produtos resultantes da degradação dos peróxidos e hidroperóxidos (produtos secundários da oxidação lipídica).

A determinação mais comum envolve a titulação iodométrica que mede o iodo (I_2) liberado de uma solução de iodeto de potássio, pelos peróxidos presentes na amostra ($2\ KI + 2\ CH_3COOH \rightarrow 2\ HI + 2\ CH_3COO\text{-}K^+$, e na sequência $ROOH + 2\ HI \rightarrow ROH + H_2O + I_2$), o

qual é titulado pelo tiossulfato (I_2 + 2 $Na_2S_2O_3$ → 2 NaS_2O + 2 NaI). Esta determinação depende muito do operador; sendo que as principais fontes de erro consistem na absorção do iodo pelas duplas ligações da gordura, e a liberação de iodo do iodeto de potássio (KI) pelo oxigênio do meio.

Assim, o índice de peróxidos (IP) consiste em determinar as substâncias que oxidam o iodeto de potássio, principalmente os peróxidos ou hidroperóxidos, expressando os resultados em miliequivalentes gramas de oxigênio por kg de amostra.

Materiais e reagentes

Erlenmeyer de 250 mL, bureta de 10 mL, balança, solução ácido acético:clorofórmio (3:2, v/v), solução saturada de iodeto de potássio, solução de tiossulfato de sódio 0,1 N, solução de amido a1% (m/v).

Procedimento

1. Pesar cerca de cerca de 5,0 g de amostra (2,5 g para amostras oxidadas) em erlenmeyer de 250 mL com tampa esmerilhada.

2. Adicionar 30 mL da mistura de ácido acético:clorofórmio (3:2, v/v), agitar.

3. Adicionar 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio (preparado recentemente), esperar exatamente 1 minuto, deixando a amostra no escuro e agitando ocasionalmente.

4. Adicionar imediatamente 30 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de amido 1%, e titular com tiossulfato de sódio 0,1 N até perda de cor azul.

5. Fazer uma amostra em branco.

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas de tiossulfato gastos na titulação, que corresponde a quantidade em equivalentes gramas de peróxidos presentes na amostra, expressando o resultado em meqg oxigênio / kg amostra.

Exemplo

Se ao titular 4,85 g de uma gordura gastou-se 0,7 mL de solução tiossulfato 0,1 N (fc = 1,1024), o índice de peróxidos será (considerando o branco = 0):

Corrigindo a concentração da solução e tiossulfato, se tem 0,11024 N (0,1 N x 1,1024), assim se tem 0,11024 eqg de tiossulfato em 1000 mL de solução. Como gastou-se 0,7 mL na titulação, neste volume contém 0,00007717 eqg (0,7 mL x 0,11024 eqg / 1000 mL) de tiossulfato de sódio.

Como a quantidade em equivalentes gramas do tiossulfato gasto é igual a quantidade de peróxidos ou oxigênio presentes na amostra, se tem 0,00007717 eqg de peróxidos ou de oxigênio.

Portanto, se tem 0,00007717 eqg oxigênio ou 0,07717 meqg oxigênio em 4,85 g de amostra ou (0,07717 eqg x 1000 / 4,85 g) 15,91 meqg de oxigênio / kg de amostra, o que corresponde ao índice de peróxidos.

Também pode ser calculado utilizando a fórmula

Índice de peróxido (meq oxigênio / kg amostra) = [(A - B) x N x f x 1000] / P

Onde: A= volume de tiossulfato gasto na amostra, B= volume de tiossulfato do branco, N= normalidade do tiossulfato, P= gramas de amostra, f= fator do tiossulfato de sódio.

6.1.6. ÍNDICE DE ANISIDINA (IA)

Os peróxidos se degradam com facilidade gerando vários compostos de natureza aldeídicas e cetônicas, dentre outras, denominadas de produtos secundários da oxidação lipídica. Estes produtos ocasionam características sensoriais indesejáveis de odor e sabor nos produtos. O IA consiste em determinar estes produtos oriundos da decomposição dos peróxidos, principalmente de compostos da classe dos aldeídos insaturados presentes na amostra.

Materiais e reagentes

p-anisidina, isooctano, ácido acético glacial, sulfato de sódio anidro, balões volumétricos de 25 mL, tubos de ensaio com tampa, pipetas de 1 e 5 mL, bureta de 5 mL, cubetas de vidro, espectrofotômetro UV-Visível.

Procedimento

1. Pesar cerca de 3,0 g de gordura em balão de 25 mL, completar o volume com isooctano.

2. Transferir a solução para cubeta de 1 cm e medir a absorbância a 350 nm (utilizar o solvente puro para zerar o aparelho).

3. Pipetar 5 mL da solução de gordura em isooctano para um tubo de ensaio, e 5 mL de solvente puro em outro tubo de ensaio.

4. Adicionar 1 mL do reagente de anisidina em cada um dos tubos de ensaio, tampar, agitar, deixar no escuro por 10 minutos.

5. Medir a absorbância da amostra a 350 nm em cubeta de 1 cm, usando como branco a solução que contém o solvente e a solução de anisidina.

Cálculo

Índice de anisidina = [25 x {1,2 x (Ea – Eb)}] / P

Onde: Ea= absorbância da mistura gordura com a anisidina, Eb= absorbância da solução de gordura com o solvente, P= gramas de amostra.

6.1.7. REAÇÃO DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA)

Este teste também se baseia na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, produtos secundários da oxidação lipídica. Um dos principais produtos formados pela decomposição dos peróxidos é o malonaldeído, o que é medido por esta reação. Neste teste uma molécula de malonaldeído reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha, o qual absorve a 532-535 nm e apresenta máximos de absorção secundários a 245 e 305 nm. A reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e a alta temperatura (100 ºC), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade.

Materiais e reagentes

Béquer de 50 mL, balão volumétrico de 100 mL, pipetas de 2 e 5 mL, centrífuga, espectrofotômetro, ácido tricloroacético 10% (m/v), ácido tiobarbitúrico em ácido acético 0,75% (m/v).

Procedimento

1. Pesar 5 g de amostra em béquer de 50 mL, dissolver com clorofórmio, transferir para balão de 100 mL, e completar o volume.

2. Transferir 5 mL da amostra para tubo de centrífuga de 20 mL, adicionar 5 mL de ácido tricloroacético a 10%, e centrifugar.

3. Transferir 4 mL do sobrenadante para tubo de ensaio, adicionar 1,25 mL da solução de ácido tiobarbitúrico a 0,75% em ácido acético glacial, e colocar o tubo de ensaio imerso em água fervendo por 10 minutos.

5. Remover, fazer a leitura em espectrofotômetro a 530 nm, usando como branco a solução preparada paralelamente à amostra.

Obs. Zerar o aparelho com clorofórmio.

Cálculo

Expressar o resultado em absorbância.

6.1.8. ABSORTIVIDADE ESPECÍFICA DE DIENOS E TRIENOS CONJUGADOS

Na oxidação de ácidos graxos poli-insaturados formam ainda na fase inicial da oxidação dienos conjugados (produtos primários), pela reorganização de duplas ligações durante a oxidação destes ácidos graxos. À medida que a oxidação avança, pela degradação de peróxidos ocorre a formação de trienos conjugados (produtos secundários da oxidação). Portanto, com estas determinações se pode ter um indício do grau da oxidação lipídica. Estes compostos conjugados absorvem na região do ultravioleta, onde os dienos conjugados absorvem em 232 nm, e os trienos conjugados a 268 nm, ambos em isooctano.

Materiais e reagentes

Espectrofotômetro, balão volumétrico de 100 mL, cubeta de 1 cm, balança analítica, iso-octano, béquer, bastão de vidro.

Procedimento

1. Pesar em béquer 1-2 g de óleo, dissolver com iso-octano.

2. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com iso-octano, ajustar a temperatura para 20-25 °C.

3. Realizar a leitura em 232 nm e 268 nm, zerando o aparelho com iso-octano.

Cálculo

O cálculo é baseado na Lei de Lambert-Beer: **Absorbância = a.c.ι**, onde, a = coeficiente de absorção (extinção), c = concentração, ι = caminho óptico.

Índice de dienos conjugados (produtos primários da oxidação) = Abs_{232} / c.ι

Onde, c = concentração do óleo em g /100 mL = caminho óptico.

Índice de trienos conjugados (produtos secundários da oxidação) = Abs_{268}/c.ι

Onde, c = concentração do óleo em g /100 mL = caminho óptico.

Exemplo

Ao ler a absorbância em 232 nm se obteve o valor de 0,346, de uma solução com 0,1 g de óleo em 10 mL, assim o índice de dienos conjugados (coeficiente %) é 0,346 (0,346 / 1 g x 1 cm).

6.2. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E POLISSACARÍDEOS

Os açúcares são carboidratos simples, que apresentam sabor doce, constituídos principalmente por monossacarídeos (como glicose, frutose, galactose) e dissacarídeos (como sacarose, maltose e lactose). Os açúcares que possuem a oxidrila do C_1, possuem a capacidade de reagir com soluções que contém cobre. No entanto, quando a ligação glicosídica envolver o grupo hemiacetálico dos dois açúcares, o açúcar é considerado não redutor, o que ocorre por exemplo com a sacarose, o quais não reagem com soluções que contém cobre. Assim, para determinar o conteúdo de açúcares redutores se titula a amostra sobre soluções contendo cobre, sob aquecimento.

Os açúcares totais incluem todos os monossacarídeos e dissacarídeos presentes no alimento que são digeridos, absorvidos e metabolizados pelo organismo humano, excluindo os polióis. Como no total de açúcares tem açúcares redutores e não redutores, primeiro se deve hidrolizar a amostra para tornar todos os açúcares presentes em redutores, e após titular sobre soluções contendo cobre, sob aquecimento.

Os polissacarídeos são polímeros de alto peso molecular constituídos pela condensação de moléculas de açúcares a través de ligações glicosídicas, incluindo dentre outros, o amido, pectina, celulose, hemicelulose, gomas, mucilagens e glicogênio.

6.2.1. AÇÚCARES TOTAIS (MÉTODO SOMOGYI-NELSON)

Este método é utilizado para amostras que contém quantidades de açúcares muito pequenas.

Materiais e reagentes

Vidrarias comuns de laboratório, papel filtro, balão volumétrico, espectrofotômetro, glicose p.a., sulfato de cobre, tartarato duplo de sódio e potássio, fosfato ácido de sódio, sulfato de sódio, ácido sulfúrico, molibdato de amônio, hidrogênio arseniato de sódio.

Procedimento

1. Pesar cerca de 5 g de amostra previamente triturada e homogeneizada em béquer de 100 mL, adicionar 50 mL de água, aquecer em banho maria por 5 minutos, esfriar.

2. Filtrar em balão volumétrico de 100 mL.

Obs. Para amostras que contém alto conteúdo de compostos nitrogenados, primeiro adicionar 1 mL de solução de acetato de chumbo concentrada, e após completar o volume com água, adicionar sulfato de sódio seco até precipitar o excesso de chumbo, e filtrar.

3. Pipetar 10 mL de solução de amostra filtrada, adicionar 10 mL de solução de ácido clorídrico 1 N, e levar ao banho maria por 15 minutos.

4. Esfriar, neutralizar com solução de hidróxido de sódio 1 N ou carbonato de sódio (utilizar papel indicador vermelho Congo para verificar o ponto de neutralização), transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água.

5. Pipetar 1 mL da amostra em tubo de ensaio e adicionar 1 mL do reativo de Somogyi, levar em banho maria por 10 minutos e esfriar.

6. Adicionar 1 mL de reativo de Nelson e 7 mL de água, ler a absorbância em espectrofotômetro a 535 nm.

7. Fazer um branco, adicionando 1 mL de água ao invés da amostra.

Obs. Zerar o aparelho com água.

Cálculo

Determinar o conteúdo de açúcares baseado na curva padrão de glicose elaborada em µg / mL. Plotar um gráfico de concentração em µg / mL de glicose (eixo x) versus absorbância (eixo y), e traçar a equação de regressão da curva (ex. y = ax + b). Tendo o valor da absorbância da amostra, pela equação encontra-se a respectiva concentração de açúcares, expressando os resultados em µg de glicose.$100g^{-1}$ de amostra.

Exemplo

Utilizou-se 5,2237 g de amostra, completou-se o volume a 100 mL, removeu-se 10 mL para hidrolizar e após completou-se novamente o volume a 100 mL. Ao ler a absorbância da amostra se obteve 0,305. Absorbância do branco foi de 0,055, assim a absorbância da amostra fica 0,250 (0,305 - 0,055). A equação de regressão obtida com glicose foi: y = 0,2224 x + 0,1199. Pela absorbância da amostra se obteve 0,585 µg / mL (0,250 - 0,1199 / 0,2224) de glicose. Nos 10 mL de solução reagente tem 5,85 µg (0,585 µg x 10 mL / 1 mL) de glicose, nos quais estão contidas 0,0052237 g de amostra (tinha

5,2237 g de amostra em 100 mL, dos quais foram removidos 10 mL e completados o volume de 100 mL, e destes foram removidos 1 mL e completados a 10 mL com a solução reagente). Assim, em 100 g de amostra se tem 111.989,59 µg (5,85 µg x 100 g / 0,0052237 g) ou 111,99 mg de açúcares, expressos em glicose por 100 g de amostra.

6.2.2. AÇÚCARES TOTAIS (MÉTODO LANE-EYNON)

Materiais e reagentes

Erlenmeyer de 250 mL, balões volumétricos de 100 mL e 250 mL, bico de Bunsen, bureta de 25 mL, soluções de "Fehling" A e B padronizadas, azul de metileno a 1% (m/v), pipetas volumétricas de 10 mL, papel tornassol, solução de glicose a 1% (m/v), ácido clorídrico 1 N, hidróxido de sódio 1 N.

Procedimento

1. Pesar cerca de 5 g de amostra previamente triturada e homogeneizada em béquer de 100 mL.

2. Adicionar 10 mL de solução de ácido clorídrico 1 N, levar ao banho maria por 15 minutos.

3. Esfriar, neutralizar com 10 mL de solução de hidróxido de sódio 1 N (utilizar papel indicador vermelho Congo para verificar o ponto de neutralização).

4. Transferir com auxílio de filtro para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água.

Obs. Para amostras ricas em compostos nitrogenados, primeiro adicionar 1 mL de solução de acetato de chumbo concentrada, e após completar o volume com água, adicionar sulfato de sódio seco até precipitar o excesso de chumbo, e filtrar.

5. Colocar a solução da amostra na bureta.

6. Em um erlenmeyer, adicionar 10 mL de solução de Fehling A e 10 mL de solução de Fehling B, adicionar 40 mL de água, levar a ebulição, adicionar 1-2 gotas de azul de metileno e titular sob ebulição com a amostra, até perda total da cor azul (passa a incolor com um precipitado avermelhado).

Cálculo

Em 10 mL de solução de Fehling A + 10 mL de solução de Fehling B = 0,00473 g glicose.

Obs. O valor real da quantidade de glicose se obtém na padronização das soluções de Fehling, pelo título da solução.

Exemplo

Ao determinar o teor de açúcares totais de 5,34 g de amostra, hidrolizada e diluída em 100 mL de água, gastou-se na titulação 1,3 mL de amostra sobre 10 mL de solução de Fehling A + 10 mL de solução Fehling B (título = 0,00436), assim o % de glicose (m/m) e´:

Como o título = 0,00436, então tem-se 0,00436g de glicose em 1,3 mL de amostra. Em 1,3 mL de amostra tem 0,0694 g (5,34 g x 1,3 mL / 100 mL) de amostra. Assim se tem 6,28 %, m/m (0,00436 g x 100 g / 0,0694 g) de açúcares, expressos em glicose %.

Também se pode utilizar a fórmula

Glicídios totais em glicose % (m/m) = [(V x f) / (v x P)] x 100

Onde: V= volume final da solução contendo a amostra (solução preparada), f= título da solução de Fehling, v= volume de amostra gasto na titulação, P= gramas de amostra presentes no volume V.

6.2.3. AÇÚCARES REDUTORES (MÉTODO LANE-EYNON)

Materiais e reagentes

Erlenmeyer de 250 mL, balões volumétricos de 100 mL e 250 mL, bico de Bunsen, bureta de 25 mL, soluções de Fehling A e B, azul de metileno a 1% (m/v), pipetas volumétricas de 10 mL, papel tornassol, solução de glicose a 1% (m/v).

Procedimento

1. Pesar cerca de 5 g de amostra previamente triturada e homogeneizada em béquer de 100 mL, levar em banho maria por 5 minutos.

2. Transferir com auxílio de filtro para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água.

Obs. Para amostras ricas em compostos nitrogenados, primeiro adicionar 1 mL de solução de acetato de chumbo concentrada, e após completar o volume com água, adicionar sulfato de sódio seco até precipitar o excesso de chumbo, e filtrar.

3. Colocar a solução da amostra na bureta.

4. Em um erlenmeyer, adicionar 10 mL de solução de Fehling A e 10 mL de solução de Fehling B, adicionar 40 mL de água, levar a ebulição, adicionar 1-2 gotas de azul de metileno e titular sob ebulição com a amostra, até perda total da cor azul (passa a incolor com precipitado avermelhado).

Cálculo

Idem ao cálculo para açúcares totais, baseado em que 10 mL de solução de Fehling A + 10 mL de solução de Fehling B = título da solução de Fehling em g de glicose.

Também se pode utilizar a fórmula

Glicídios redutores em glicose % (m/m) = [(V x f) / (v x P)] x 100

Onde: V= volume final da solução contendo a amostra (solução preparada), f = título da solução de Fehling, v= volume de amostra gasto na titulação, P= gramas de amostra presentes no volume V.

Obs. Caso o teor de açúcares for pequeno, pode-se utilizar uma quantidade maior de amostra ou reduzir a quantidade de solução de Fehling na titulação para 5 mL ao invés de 10 mL. O tempo de titulação não pode exceder a 3 minutos, porque o óxido cuproso pode se oxidar novamente e retornar à coloração azulada, e pode haver decomposição de açúcares.

6.2.4. AÇÚCARES NÃO REDUTORES (MÉTODO LANE-EYNON)

Baseia-se na diferença entre os açúcares totais e açúcares redutores

Açúcares não redutores em sacarose % (m/m) = (% açúcares totais - % de açúcares redutores) x 0,95.

6.2.5. AMIDO (MÉTODO LANE-EYNON)

O amido é constituído pela amilose e amilopectina, em diferentes proporções. A amilose é um polissacarídeo formado por unidades de glucopiranoses unidas por ligações glicosídicas α 1-4 (forma helicoidal), enquanto a amilopectina é formada por unidades de glicopiranose unidas por ligações α 1-4, as quais se unem por ligações α 1-6 (forma ramificada). Pela degradação parcial do amido formam-se as dextrinas, as quais possuem estrutura semelhante ao amido, mas de menor peso molecular e maior solubilidade, e continuando a degradação ainda pode-se obter a maltose e finalmente as unidades de glicose.

Materiais E Reagentes

Éter etílico, álcool etílico a 70% e 95% (v/v), carbonato de cálcio, solução de acetato de chumbo saturada, soluções de Fehling padronizadas, ácido clorídrico, solução de hidróxido de sódio a 10% (m/v).

Procedimento

1. Pesar 5-10 g de amostra previamente triturada e homogeneizada em béquer de 250 mL, adicionar éter etílico até cobrir a amostra, decantar, e repetir a operação por mais duas vezes.

2. Transferir o material desengordurado para erlenmeyer de 500 mL com auxílio de 100 mL de álcool a 70% (v/v).

3. Agitar, cobrir com vidro de relógio, aquecer por 1 hora em banho maria, esfriar, deixar em repouso por 12 horas, filtrar (ou centrifugar por 15 minutos / 1.500 rpm) com auxílio de 500 mL de álcool a 70% (v/v).

4. Transferir o resíduo juntamente com o papel de filtro para erlenmeyer de 500 mL com auxílio de 200 mL de água, adicionar 0,5 mL de hidróxido de sódio a 10% (m/v), aquecer em autoclave a 1 atm / 1 hora.

5. Esfriar, adicionar 5 mL de solução de HCl concentrado, e levar a autoclave por mais 30 minutos / 1 atm.

6. Neutralizar a solução com NaOH a 10% (m/v), transferir para balão volumétrico de 250 mL, e completar o volume com água, deixar decantar, filtrar e colocar a solução em bureta de 25 mL.

7. Titular sobre 10 mL de solução de Fehling A e 10 mL de solução de Fehling B, mais 40 mL de água e 1-2 gotas de azul de metileno, contidos em erlenmeyer, sob ebulição, até perda da cor azul.

Cálculo

Utilizar o mesmo cálculo realizado para açúcares totais, multiplicando pelo fator 0,9.

Também se pode utilizar a fórmula

Amido % (m/m) = (100 x V x f x 0,9) / (P x v)

Onde, V= volume final da solução contendo a amostra (solução preparada), f= título da solução de Fehling, v= volume de amostra gasto na titulação, P= gramas de amostra.

6.2.6. PECTINA

As substâncias pécticas são constituídas em sua maioria por cadeias de ácidos galacturônicos, incluindo a pectina e protopectina. As pectinas podem formar géis estáveis na presença de água, acidez adequada e açúcares.

Materiais e reagentes

Balança analítica, banho Maria, cápsula de alumínio, dessecador, estufa, papel filtro, solução de ácido acético 1 N, solução de cloreto de cálcio 2 N, solução de hidróxido de sódio 1 N, solução de nitrato de prata 1% (m/v).

Procedimento

1. Pesar 50-100 g de amostra em béquer de 800 mL, adicionar 400 mL de água destilada, ferver por 1 hora (recolocando a água perdida), esfriar.

2. Agitar, filtrar em erlenmeyer de 500 mL, transferir para balão de 500 mL, completar o volume com água.

3. Retirar uma alíquota de 100 mL em béquer de 500 mL, adicionar 300 mL de água destilada e 10 mL de hidróxido de sódio 1 N, deixar em repouso por 12 h agitando continuamente.

4. Adicionar 50 mL de solução de ácido acético 1 N, esperar por 5 minutos, adicionar 50 mL de solução de cloreto de cálcio 2 N, sob agitação.

5. Ferver por 1 minuto, deixar em repouso por 1 hora, filtrar em papel filtro, lavar o papel filtro com água quente para remover o cloreto livre (testar com nitrato de prata).

6. Transferir o resíduo do filtro para cápsula de alumínio previamente tarada, evaporar em banho maria, deixar em estufa a 100 ^{0}C por 3 horas, esfriar, pesar.

Cálculo

Calcular o % m/m relacionando a quantidade de pectato de cálcio formado em relação a quantidade de amostra utilizada.

Exemplo

Inicialmente foi pesado 64,50 g de amostra, e ao final se obteve um resíduo de 2,1237 g. Assim, tem-se 2,1237 g de pectato de cálcio em 64,50 g de amostra, o que equivale a 3,29 %, m/m (2,1237 g x 100 g / 64,50 g) de pectato de cálcio.

6.3. DETERMINAÇÃO DE MINERAIS

A presença em quantidades adequadas de minerais nos alimentos desempenha um papel nutricional muito importante. O teor de minerais, no geral, é muito pequeno nos alimentos na forma *in natura*, e se concentra em alguns frutos, hortaliças e alguns tecidos animais. No entanto, em alimentos processados, seu conteúdo pode estar em quantidades

maiores devido a concentração em função do processamento ou adição na forma de suplementação.

Os minerais podem ser determinados por várias técnicas analíticas, mas a utilização de espectrofotometria de absorção atômica (minerais em geral) e fotometria de chama (Na e K), são as técnicas mais empregadas, e que possuem maior sensibilidade e exatidão nas medidas.

A determinação de minerais, como ferro e cálcio, pode ser realizada por absorção atômica ou por métodos espectrofotométricos (ferro) ou de precipitação (cálcio). Atualmente é muito utilizado análises de minerais, incluindo o Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn, por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente após dissolução parcial ácida e total da matéria orgânica por digestão via seca. No entanto, algumas técnicas menos sofisticadas ainda são utilizadas para a determinação de alguns minerais.

6.3.1. SÓDIO

Materiais e reagentes

Balões volumétricos de 100 mL, fotômetro de chama, solução padrão de cloreto de sódio.

Procedimento

1. Colocar no aparelho (fotômetro) o filtro de sódio, ligar o compressor e o gás.

2. Regular a entrada de ar até o manômetro atingir 10 libras por pol^2, ligar a chave do aparelho e destravar a chave do galvanômetro.

3. Encher uma das cubas com água destilada e mergulhar nela o atomizador, zerar o aparelho.

4. Encher uma cuba com a solução-padrão de sódio ou potássio (que deverá ter aproximadamente uma concentração duas vezes superior à da amostra), e acertar o 100 do aparelho.

5. Confirmar o zero novamente com água destilada, e o 100 com solução-padrão.

6. Mergulhar o atomizador em água destilada, para limpá-lo, depois, mergulhar o atomizador na amostra e fazer a leitura.

Cálculo

Cloreto de sódio (mg / L amostra) = (L x c) / 100

Onde, L = leitura da amostra, c = concentração do padrão de cloreto de sódio utilizado.

6.3.2. FERRO

Materiais e reagentes

Ácido clorídrico concentrado, solução de α, α' dipiridila a 0,1% (m/v), solução tampão de acetato:ácido acético, cloridrato de hidróxilamina a 10% (m/v), solução estoque de ferro, solução padrão de ferro, pipetas, balões volumétricos de 50-100 mL, mufla, banho Maria, espectrofotômetro.

Procedimento

1. Pesar cerca de 5 g de amostra e incinerar a 550 ^{0}C, adicionar às cinzas 5 mL de HCl concentrado, secar em banho maria e incinerar novamente.

2. Adicionar 2 mL de HCl concentrado, evaporar em banho maria, dissolver com água, transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água.

3. Pipetar 10 mL de amostra para béquer de 150 mL, adicionar 1 mL de cloridrato de hidróxilamina a 10% (m/v), aquecer sob ebulição por 10 minutos, esfriar, transferir para balão volumétrico de 50 mL, adicionar 5 mL de solução tampão de acetato:ácido acético, e 2 mL de solução de dipiridila a 0,1% (m/v), completar o volume com água.

4. Preparar um branco, seguindo o mesmo procedimento.

5. Fazer a leitura em espectrofotômetro após 10 minutos do desenvolvimento da cor vermelha, a 510 nm.

Cálculo

Plotar um gráfico de concentração de ferro (eixo x) versus absorbância (eixo y), e encontrar a equação de regressão da curva (y = ax + b). Tendo o valor da absorbância da amostra, pela equação encontra-se a respectiva concentração de ferro, expressando os resultados mg ferro. 100g^{-1} de amostra (b.u.).

Exemplo

Utilizou-se 5,0075 g de amostra, completou-se o volume a 100 mL, e removeu-se 10 mL para realizar a reação em balão de 50 mL. Ao ler a absorbância da amostra se obteve 0,415. Absorbância do branco foi de 0,078, assim a absorbância da amostra fica 0,337 (0,415 - 0,078). A equação de regressão obtida do ferro foi: y = 3,2574 x + 0,21983. Pela absorbância da amostra se obteve 0,11717 mg (0,337 - 0,21983 / 3,2574) de ferro em 0,50075 g de amostra (5,0075 g x 10 mL / 100 mL). Calculando em 100 g de amostra se obtém 23,40 mg (0,11717 mg x 100 g / 0,50075 g) de ferro em 100 g de amostra.

6.3.3. CÁLCIO

Materiais e reagentes

Balança analítica, cadinho de porcelana, chapa aquecedora, forno mufla, medidor de pH, papel filtro, vidraria comum de laboratório, ácido nítrico p.a., solução de NH_4OH 1+1 (v/v) e 1+50 (v/v), solução de oxalato de amônio [$(NH_4)_2C_2O_4.H_2O$] saturada, solução de $KMNO_4$ 0,1 N, ácido sulfúrico p.a., solução de ácido clorídrico 1+3 (v/v), vermelho de metila a 0,1% (m/v).

Procedimento

1. Pesar exatamente 5 g de amostra em cadinho de porcelana previamente lavado com ácido nítrico.

2. Incinerar em mufla a 550 ^{0}C por 12 horas, dissolver as cinzas em béquer de 600 mL com 40 mL de solução de ácido clorídrico (1+3, v/v) e algumas gotas de HNO_3 (10 gotas).

3. Lavar o cadinho com água destilada e levar à ebulição em chapa aquecedora, deixar esfriar e adicionar 2 gotas de vermelho de metila 0,1% (m/v) (cor rosa).

4. Adicionar lentamente solução de NH_4OH (1+1, v/v) até pH 5,6 (cor laranja-marrom). Ao adicionar o NH_4OH pode acontecer que passe direto para a cor amarela, neste caso, ajustar a coloração até laranja - marrom com algumas gotas de solução de HCI (1+3, v/v).

5. Após, adicionar algumas gotas de solução de HCI (1+3, v/v) até se obter a coloração rósea.

6. Diluir até 150 mL com água destilada, levar à ebulição e ainda na chapa aquecedora, adicionar lentamente a solução de oxalato de amônio, agitando com bastão de vidro até que não haja mais precipitado branco. Se a cor mudar para laranja, adicionar algumas gotas de solução de ácido clorídrico (1+3, v/v) (até que a cor volte para o rosa claro).

7. Deixar em repouso por 12 horas, filtrar, lavar o papel de filtro cuidadosamente com solução de NH_4OH (1+50, v/v) até que desapareça a coloração rosa do filtrado.

8. Transferir o papel de filtro com o resíduo para o mesmo béquer onde se processou a precipitação, e adicionar uma mistura de 125 mL de água destilada e 5 mL de solução de H_2S0_4 concentrado.

9. Aquecer até 70 ^{0}C e titular com solução de $KMNO_4$ 0,1 N, até uma coloração rosa claro persistente (cuidar para que a temperatura não fique abaixo de 60^{0}C).

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas de permanganato gastos na titulação, que corresponde aos equivalentes gramas de cálcio presente na amostra.

Exemplo

Se ao titular o resíduo final resultante das 5,0 g de uma amostra gastou-se 3,7 mL de solução de permanganato 0,1 N (fc = 1,0041), o teor de cálcio em % (m/m) será:

0,1 N x 1,0041 = 0,10041 N, assim: se tem 0,10041 eqg de permanganato em 1000 mL de solução. Como gastou-se 3,7 mL na titulação, neste volume contém: (3,7 mL x 0,10041 eqg/ 1000 mL) 0,0003715 eqg de tiossulfato. Esse valor equivale a quantidade de equivalentes gramas do cálcio na amostra, ou seja, 0,0003715 eqg. Assim, se tem (0,0003715 x 20,04) 0,0074 g de cálcio em 5,0 g de amostra. Portanto, isto equivale a (0,0074 g x 100 g / 5,0 g) 0,15 % (m/m)

Também se pode utilizar a fórmula

Cálcio % (m/m) = [V x f x 0,2004] / P

Onde, V= volume de permanganato gasto na titulação, f= fator de correção da solução de permanganato, 0,2004 = meq do Ca x 100, P= peso da amostra em g.

CAPÍTULO

07 Análises relacionadas aos compostos bioativos

NUTRIENTES E SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Nutrientes são substâncias químicas consumidas normalmente como componente de um alimento, que proporcione energia, que seja necessária para o crescimento, o desenvolvimento e a manutenção da saúde e da vida ou cuja carência resulte em mudanças químicas ou fisiológicas características.

Substâncias bioativas são nutrientes ou não nutrientes consumidos normalmente como componente de um alimento, que possuem ação metabólica ou fisiológica específica no organismo humano.

Uma das principais ações fisiológicas dos compostos bioativos consiste na capacidade de reagirem com radicais livres, atuando como antioxidantes naturais.

Dentre estas substâncias estão os compostos fenólicos, flavonóides, carotenóides, tocoferóis, clorofilas e algumas vitaminas.

7.1. DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

7.1.1. PREPARO DO EXTRATO

Para muitas análises relacionadas a quantificação de compostos bioativos, como para a determinação de compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante, é necessário realizar uma extração prévia dos compostos presentes na amostra, na forma de extratos.

Os extratos podem ser obtidos por diferentes maneiras, mas o mais comum consiste na extração com água, etanol, metanol, com uma mistura de água:álcool ou água acidificada, ou ainda com soluções eutéticas. Ao final da extração a solução pode ser centrifugada, filtrada, concentrada por evaporação à vácuo ou liofilizada. A utilização de um ou outro solvente, ou pela mistura de solventes, depende muito da aplicação posterior do extrato. Se o extrato for utilizado apenas para determinações analíticas, no sentido de quantificar ao máximo os compostos de uma determinada matéria prima, pode-se utilizar qualquer solvente ou mistura de solventes que proporcione o maior percentual de extração dos compostos desejados. No entanto, se o extrato for utilizado em uma matriz alimentícia, precisa-se extrair apenas com solventes que sejam seguros para o organismo humano, como água, etanol ou com uma mistura de água e etanol, para poder aplicar este extrato na matriz alimentícia.

A amostra pode estar na forma *in natura* ou liofilizada, e se na forma *in natura* deve estar bem triturada para aumentar a superfície de contato e favorecer assim a extração dos compostos desejados. A proporção de amostra:solvente no processo de extração também pode variar, assim como o tempo e temperatura da extração.

Como exemplo, pode-se utilizar em torno de 5 g de amostra em tubo de Falcon de 50 mL, adicionar de 35 mL de água (etanol ou mistura de água : etanol, ou água acidificada com um ácido orgânico), submeter à agitação por 2 horas ou deixar em ultrassom por 30 minutos, centrifugar a 3420g por 10 minutos, transferir o sobrenadante para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água. Este extrato pode ser utilizado na forma de solução ou pode ser liofilizado para posterior caracterização e aplicação.

7.1.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos que apresentam uma grande diversidade de estruturas químicas, as quais contém pelo menos um anel aromático ao qual está ligado pelo menos um grupo hidroxila. Estes compostos podem ser classificados em várias classes, dentre elas os flavonóides, isoflavonóides, ácidos fenólicos, taninos e lignanas.

Estes compostos são oriundos do metabolismo secundário das plantas, desempenhando funções importantes nos vegetais, muitos deles são considerados antioxidantes naturais, e muitos possuem características adstringentes, são solúveis em água e em solventes orgânicos polares, e absorvem na região do espectro infravermelho.

O teor total de compostos fenólicos é um ensaio simples, reprodutível e amplamente utilizado, fundamentado na redução do reagente Foling-Ciocalteau por compostos fenólicos em meio alcalino, ou seja, envolve a oxidação de fenóis em meio básico, pelo reagente de cor amarela de Folin-Ciocalteau. O reagente de Folin consiste na mistura dos ácidos fosfomolíbdico ($H_3PO_4.12MoO_3$) e o ácido fosfotúngstico ($H_3PO_4.12WO_3$), em que reação de oxidação resulta em um composto de cor azul (molibdotungstofosfato), a qual ocorre em função da composição quantitativa de compostos fenólicos, e do pH da solução obtido geralmente pela adição de carbonato de sódio, cuja absorção máxima é medida a 750 nm.

No entanto, esta técnica não apresenta especificidade, por não fazer a distinção entre os diferentes tipos de compostos fenólicos (polifenóis ou monofenóis), e além disso, existem outras substâncias que reagem com o reagente de Folin, provocando interferências no método, como das aminas alifáticas terciárias, aminas terciárias presentes em tampões biológicos, aminoácidos como a tirosina e o triptofano, hidroxilaminas, hidrazinas, certas purinas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, açúcar, Fe (II) e diversos agentes redutores orgânicos e inorgânicos.

Materiais e reagentes

Agitador de tubos, balão volumétrico de 100 mL, tubos Falcon de 15 mL, ácido gálico, carbonato de sódio 1,5 N, solução de Folin-Ciocalteau 0,25 N, metanol p.a.

Procedimento

1. Em um tubo de Falcon de 5 mL, adicionar 50 µL do extrato previamente obtido e 250 µL da solução de Folin-Ciocalteau 0,25 N, agitar, e deixar reagir por 8 minutos na ausência de luz.

3. Após adicionar 200 µL de carbonato de sódio 1,5 N e deixar reagir por 90 minutos na ausência de luz.

4. Realizar a leitura em espectrofotômetro em 765 nm.

5. Fazer um branco, ou seja, uma solução preparada da mesma forma, mas substituindo o volume do extrato por 50 µL do mesmo solvente utilizado para a diluição do extrato.

Obs. Zerar o aparelho com o mesmo solvente utilizado para diluir o extrato.

Cálculo

Para a quantificação dos compostos fenólicos utilizar uma curva de padrão preparada com ácido gálico ou com outro composto fenólico majoritário na amostra. Ao final, plotar um gráfico de concentração em mg de ácido gálico (eixo x) versus absorbância (eixo y), e traçar a equação de regressão da curva (y = ax + b). Tendo o valor da absorbância da amostra, pela equação encontra-se a respectiva concentração dos compostos fenólicos, expressando os resultados em mg de ácido gálico (EAG). $100g^{-1}$ de amostra.

Exemplo

Tendo a equação de regressão linear simples do padrão de ácido gálico: y = 0,15757 x + 0,049897. Ao fazer a leitura da amostra encontrou-se a absorbância da amostra de 0,324 e do branco 0,181, assim a absorbância da amostra fica 0,143 (0,324 - 0,181). Pela equação a concentração de fenóis na amostra é de 0,5909 mg / mL (0,143 - 0,049897 / 0,15757). Inicialmente, para obter o extrato foi utilizado 7,0324 g de amostra e completado o volume de 10 mL, e destes foram retirados 50 µL para fazer a reação. Nestes 50 µL contêm 0,035162 g (7,0324 g x 50 µL / 10.000 µL) de amostra. Os 50 µL de amostra foram completados a 500 µL com a solução reagente. Como se tem 0,5909 mg / mL de fenóis, assim nos 500 µL de solução reagente se tem 0,29545 mg (0,5909 mg x 0,5 mL / 1mL) de fenóis em 0,035162 g de amostra. Assim, em 100 g de amostra teria 840,25 mg (0,29545 mg x 100 g / 0,035162 g) de compostos fenólicos expressos em ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra.

Também se pode calcular pelo fator de diluição total.

Inicialmente se tinha 0,70324 g / mL (7,0324 g / 10 mL), de onde se retirou 50 µL (0,035162 g), e se diluiu a 500 µL, tendo então 0,070324 g / mL (0,035162 g / 0,5 mL). Assim, a solução foi diluida 10 vezes, e a amostra inicial estava diluida 10 vezes, perfazendo uma diluição de 100 vezes. Portanto, multiplicando o valor encontrado pela equação (0,5909 mg / mL) por 100 vezes, se obtêm 59,09 mg no volume inicial, o qual contêm 7,0324 g de amostra, o que equivale a 840,25 $mg.100g^{-1}$ (59,09 mg x 100 g / 7,0324 g) de amostra.

Ou ainda, se pode calcular pelo fator de diluição parcial.

Multiplicando o valor encontrado pela equação (0,5909 mg / mL) pela diluição de 10 vezes, se obtêm 5,909 mg / mL no volume inicial de 10 mL. Assim, nos 10 mL teria 59,09 mg, nos quais contêm 7,0324 g de amostra, o que equivale a 840,25 $mg.100\ g^{-1}$ (59,09 mg x 100 g / 7,0324 g) de amostra.

7.1.3. FLAVONÓIDES

Os flavonóides representam uma das classes mais importantes de compostos fenólicos presentes nos vegetais que incluem inúmeros compostos. Desempenham vários papéis nas plantas, assim como nas características de sabor, aroma e cor, podendo variar de cor do vermelho intenso, laranja, violeta e azul.

Os flavonóides são compostos heterocíclicos com oxigênio na molécula. Apresentam o seu núcleo estrutural constituído pelo íon flavílium, do qual se derivam os diferentes flavonóides, como as antocianinas, antocianidinas, isoflavonas, dentre inúmeras outras. São solúveis em água e em solventes polares, e absorvem na região do espectro visível. Os flavonóides são os principais compostos fenólicos associados com a atividade antioxidante.

Materiais e reagentes

Agitador de tubos, balão volumétrico de 25 e 1000 mL, tubos Falcon de 15 mL, catequina, cloreto de alumínio 10% (m/v), hidróxido de sódio 1 M, nitrito de sódio 5% (m/v).

Procedimento

1. Pipetar 100 µL a 1 mL de extrato previamente obtido para tubo de Falcon de 15 mL, adicionar 4 mL de água destilada, mais 300 µL de solução de $NaNO_2$ 5% (m/v), agitar em vórtex por 10 segundos, e deixar em repouso por 5 minutos.

2. Após adicionar 300 µL de solução de $AlCl_3$ 10% (m/v), agitar em vórtex por 10 segundos, deixar em repouso por 5 minutos, e adicionar 2 mL de solução de NaOH 1 M.

3. Realizar a leitura em espectrofotômetro no UV visível em comprimento de onda de 510 nm.

4. Fazer um branco, utilizando o mesmo procedimento substituindo o volume de extrato pelo mesmo volume de água destilada.

Obs. Zerar o aparelho com água destilada.

Cálculo

A quantificação do total de flavonóides da amostra é realizada por meio de uma curva padrão preparada com catequina ou outro flavonóide majoritário (como epicatequina ou quercitina) na amostra. Plotar um gráfico de concentração em µg / mL de catequina (eixo x) versus absorbância (eixo y), e traçar a equação de regressão da curva (y = ax + b). Tendo o valor da absorbância da amostra, pela equação encontra-se a respectiva concentração dos flavonóides, expressando os resultados em µg de catequina.$100g^{-1}$ de amostra.

Exemplo

Tendo a equação de regressão linear simples do padrão de catequina: y = 0,2135 x + 0,09782. Ao fazer a leitura da amostra encontrou-se a absorbância da amostra de 0,394 e do branco 0,123, assim a absorbância da amostra fica 0,271 (0,394 - 0,123). Pela equação, a concentração de flavonóides na amostra é de 0,81115 µg / mL (0,271 - 0,09782 / 0,2135). O extrato inicial foi obtido com 5,1267 g e diluído a 10 mL, e destes foram retirados 1 mL para fazer a reação. Nestes 1 mL contêm 0,51267 g (5,1267 g x 1 mL / 10 mL) de amostra, que foi diluído a 7,6 mL da solução reagente. Portanto, se tem 0,81115 µg / mL de flavonóides nos 7,6 mL da solução, o que equivale a 6,1647 µg nos 7,6 mL (0,81115

µg x 7,6 mL), que contém 0,51267 g de amostra. Assim, em 100 g de amostra teria 1.202,47 µg (6,1647 µg x 100 g / 0,51267 g) de flavonóides expressos em catequina por 100 g de amostra.

Também se pode calcular pelo fator de diluição total.

Inicialmente se tinha 0,51267 g / mL (5,1267 g / 10 mL), de onde se retirou 1 mL (0,51267 g) para fazer a reação em 7,6 mL de solução reagente, tendo, portanto, 0,06746 g / mL. Assim, a solução foi diluida 7,6 vezes, e a amostra inicial estava diluida 10 vezes, perfazendo uma diluição de 76 vezes. Portanto, multiplicando o valor encontrado pela equação (0,81115 µg / mL) por 76 vezes, se obtém 61,6474 µg no volume inicial, o qual contêm 5,1267 g de amostra, o que equivale a 1.202,47 $\mu g.100g^{-1}$ (61,6474 µg x 100 g / 5,1267 g) de amostra.

Ou ainda, se pode calcular pelo fator de diluição parcial.

Multiplicando o valor encontrado pela equação (0,81115 µg / mL) pela diluição de 7,6 vezes, se obtém 6,16474 µg / mL no volume inicial de 10 mL. Assim, nos 10 mL teria 61,6474 µg, nos quais contêm 5,1267 g de amostra, o que equivale a 1.202,47 $\mu g.100g^{-1}$ (61,6474 µg x 100 g / 5,1267 g) de amostra.

7.1.4. CAROTENÓIDES

Os carotenóides são compostos apolares que possuem em sua estrutura o isopreno, sendo classificados em carotenos, quando possuem apenas carbono e hidrogênio; e xantofilas, que são derivados da oxidação dos carotenos, podendo conter grupos OH, CH_3-O, COOH e C=O. Alguns carotenóides são precursores da vitamina A, como o α, β, ɣ caroteno e α, β criptoxantina, tendo o β caroteno 100% de conversão em vitamina A. Estes compostos podem apresentar coloração do amarelo ao vermelho, sendo solúveis em solventes apolares, e são considerados antioxidantes naturais. No entanto, estes compostos de oxidam com facilidade devido as suas duplas ligações. Os carotenóides absorvem na região do espectro visível.

A determinação do total de carotenóides em uma amostra ocorre através de métodos espectrofotométricos, enquanto a determinação de carotenóides individuais ocorre por metodologias envolvendo cromatografia líquida (HPLC).

Materiais e reagentes

Acetona, celite, éter de petróleo, sulfato de sódio anidro, balança, béquer de 100 e 500 mL, funil, funil de Büchner, funil de separação, balão volumétrico de 100 mL, espectrofotômetro.

Procedimento

1. Adicionar 2 g de celite a 5 g de amostra triturada em um béquer e misturar.

2. Adicionar aproximadamente 20 mL de acetona gelada, homogeneizar por 10 minutos.

3. Filtrar a amostra do béquer, transferir toda com acetona gelada, em funil de Büchner forrado com papel filtro, lavando o resíduo com acetona até que o resíduo do filtro fique incolor.

4. Transferir o filtrado para um funil de separação, acrescentar 30 mL de éter de petróleo e 30 mL de água destilada. Após a separação de fases, descartar a fase inferior e

continuar lavando a fase superior com água destilada para remoção total da acetona (utilizar aproximadamente de 2 a 2,5 L de água).

5. Transferir o extrato contendo o pigmento para um balão volumétrico de 100 mL com auxílio de um funil contendo algodão, no qual é colocado um pouco de sulfato de sódio anidro (lavar a parte inferior da haste do funil de separação com éter de petróleo), e aferir o balão com éter de petróleo.

6. Fazer a leitura em espectrofotômetro a 450 nm.

Obs. Utilizar o éter de petróleo para zerar o aparelho.

Cálculo

O cálculo se baseia na Lei de Lambert-Beer: **Absorbância = Ɛ.c.ι**, onde Ɛ = coeficiente de absorção (extinção) molar ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$), c = concentração (mol / L), ι = caminho óptico (cm). Para expressar em β-caroteno (massa molar 536,87 $g.mol^{-1}$) se utiliza a sua absortividade molar no solvente utilizado (13900 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ em éter de petróleo) ou sua absortividade % (2594 $g.mL^{-1}$ em éter de petróleo).

Exemplo

Ao utilizar 3,5028 g de amostra e diluir ao final a 100 mL, se obteve a absorbância de 0,360. Pela Lei de Beer se btém a concentração de 0,000138782 $g.100mL^{-1}$ (0,360 / 2594 x 1 cm). Expressando em $\mu g.g^{-1}$ de amostra, se obtém 138,78 $\mu g.100\ mL^{-1}$ (0,000138782 x $1x10^6$). Nos 100 mL de solução, onde contém 3,5082 g de amostra, se obtém 39,62 µg de carotenóides (138,78 µg x 1 g / 3,5028 g) expressos em β-caroteno por grama de amostra.

Pode-se fazer o mesmo cálculo utilizando o Ɛ, assim pela Lei de Beer se obtém 0,0000025899 $mol.L^{-1}$ (0,360 / 13900 x 1), que corresponde a 0,0013904396 $g.L^{-1}$ (0,000025899 mol x 536,87 g / 1 mol). Nos 100 mL de amostra teria 0,00013904396 g de carotenóides (0,013904396 g x 100 mL / 1000 mL). Nos 100 mL de amostra tem 3,5028 g de amostra, então se obtém 0,000039695 $g.g^{-1}$ (0,00013934396 g x 1 g / 3,5028 g), ou 39,96 µg de β-caroteno.g^{-1} de amostra."

Total de carotenóides (µg β-caroteno / g) = (Abs x V x 10^6) / (2492 x 100 x g)

Onde, Abs = absorbância da amostra, V = volume da solução em mL, g = gramas de amostra, 2492 = coeficiente de absorção do β-caroteno.

Para se fazer a conversão em vitamina A, se utiliza: 1 µg de equivalente de atividade de retinol (RAE) = 3,33 UI de vitamina A = 1 µg de retinol = 12 µg de betacaroteno.

7.1.5. CLOROFILAS

As clorofilas são a classe de pigmentos mais abundante na natureza, sendo responsáveis pela cor verde dos vegetais, estando associadas com o processo de fotossíntese. Estes compostos estão nos cloroplastos associados com ligações fracas com lipídios, proteínas e carotenoides.

As principais clorofilas são a clorofila a e a clorofila b, que apresentam em sua estrutura um anel isocíclico ao núcleo da porfirina. Estes compostos são altamente instáveis e podem se degradar rapidamente na presença da luz e variações de pH, alterando sua coloração de um verde brilhante ao marrom.

As clorofilas são solúveis em água e em solventes polares, e absorvem na região espectral do visível.

Materiais e reagentes

Acetona 80% (v/v), balança analítica, almofariz, pipetas de 5 mL, centrífuga, balão volumétrico de 25 mL, espectrofotômetro.

Procedimento

1. Pesar 1 g de amostra em béquer, adicionar 5 mL de acetona a 80% (v/v) e macerar em almofariz.

2. Centrifugar o material a 4000 rpm por 10 minutos, transferir o sobrenadante para balão volumétrico de 25 mL, e completar o volume com acetona a 80% (v/v).

3. Fazer a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 647 e 663 nm.

Obs. Utilizar a acetona a 80% (v/v) para zerar o aparelho.

Cálculo

O cálculo é baseado na Lei de Lambert-Beer: **Absorbância = a.c.ι**, onde, a = coeficiente de absorção (extinção), c = concentração, ι = caminho óptico. Assim, o cálculo do teor total de clorofilas, e os teores de clorofilas *a* e *b* através das equações, que levam em consideração a absortividade molar das clorofilas em comprimentos de onda de 645 e 663 nm.

Clorofila *a* ($\mu g.mL^{-1}$) = 12,25 (Abs_{663}) – 2,79 (Abs_{645})

Clorofila *b* ($\mu g.mL^{-1}$) = 21,50 (Abs_{645}) – 5,10 (Abs_{663})

Total de clorofilas ($\mu g.mL^{-1}$) = Clorofila *a* ($\mu g.mL^{-1}$) + Clorofila *b* ($\mu g.mL^{-1}$) = 7,15 (Abs_{663}) + 18,71 (Abs_{645})

Onde, Abs= absorbância

Para expressar os resultados em $\mu g.g^{-1}$ deve-se multiplicar pelo fator que expressa a relação do volume final utilizado na diluição da amostra, tanto para a clorofila *a*, *b* ou no conteúdo total de clorofilas.

Exemplo

No caso de ter utilizado 1,0820 g de amostra em um volume final de 25 mL, e o total de clorofilas encontrado foi de 346,83 $\mu g.mL^{-1}$, se obtêm 8.670,75 µg (346,83 µg x 25 mL) de clorofilas nos 25 mL de solução. Nos 25 mL tem 1,0820 g de amostra, expressando em $\mu g.g^{-1}$ de amostra, se obtêm 8.013,63 µg (8.670,75 µg x 1 g / 1,0820 g) ou 8,01 mg de clorofilas totais por grama de amostra.

7.1.6. TOCOFERÓIS

Os tocoferóis são compostos hidrofóbicos, considerados como potentes antioxidantes naturais. Este grupo compreende o α, β, γ e δ- tocoferóis, os quais possuem atividade biológica específicas, além de serem precursores da vitamina E. A determinação dos tocoferóis pode ser realizada por cromatografia liquida de alta performance utilizando uma coluna de fase normal, utilizando o detector de fluorescência, com comprimento de onda (λ) de excitação 290 nm e comprimento de onda (λ) de emissão em 330 nm.

Materiais e reagentes

Balança analítica, vidraria comum de laboratório, solução padrão de tocoferóis, funil de separação, vial de 1,5 mL, balão volumétrico, tubos de eppendorf, centrífuga, hexano, etanol, cromatógrafo líquido com coluna de fase normal e detector de fluorescência.

Procedimento

1. Extrair a fração lipofílica da amostra utilizando a metodologia de Bling & Dyer.

2. Transferir 0,50 g da fração lipofílica com auxílio de hexano, para balão volumétrico de 5 mL, e completar o volume com hexano.

3. Transferir cerca de 1 mL para tubos de eppendorf, centrifugar à 9000 rpm por 6 minutos ou filtrar com filtros de 0,4 µm.

4. Retirar uma alíquota do sobrenadante e injetar no cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), acoplado ao detector de fluorescência.

Condições cromatográficas

Utilizar coluna de fase normal, utilizando uma fase móvel isocrática de hexano : isopropanol, 98,5 : 1,5 (v/v), com o fluxo de 1,0 mL.min^{-1}, e detector de fluorescência com excitação em 290 nm e emissão em 330 nm.

Identificação e quantificação

A identificação se faz em comparação com uma mistura padrão contendo os diferentes tocoferóis, e a quantificação se faz em função da equação de regressão das curvas (y = ax + b) dos padrões individuais de α, β, γ e σ- tocoferóis. Tendo o valor da área do pico da amostra, pela equação de regressão dos padrões encontra-se a respectiva concentração dos tocoferóis, expressando os resultados em µg.100 g^{-1} amostra, no próprio software do equipamento. O conteúdo total de tocoferóis se obtém pela soma dos conteúdos dos diferentes tocoferóis presentes na amostra.

Para a conversão em vitamina E se utiliza: 1 mg de alfa-tocoferol = 1 mg de alfa tocoferol (natural) = 1,49 UI.

7.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante consiste na capacidade de uma determinada substância de neutralizar a ação dos radicais livres no organismo humano, reduzindo ou retardando processos oxidativos.

Devido à grande diversidade química dos antioxidantes presentes em uma matriz alimentícia, fica difícil de avaliar a contribuição individual de cada componente na

atividade antioxidante. Assim, é mais utilizado a medida da atividade antioxidante que considera a ação de todos os compostos antioxidantes da amostra. Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, não se tem um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante de uma matriz possa ser medida precisa e quantitativamente.

Por isso, vários ensaios foram desenvolvidos para determinar atividade antioxidante de uma amostra, os quais variam quanto aos radicais gerados e o mecanismo de atuação. Dentre os principais ensaios destacam-se o DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil), ABTS (2,20-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power) e ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

Entretanto, a interpretação e comparação dos resultados obtidos através dessas metodologias pode se tornar uma tarefa árdua. A fim de tentar gerar dados que possam ser facilmente comparáveis, foi introduzido nos diferentes métodos o mesmo antioxidante padrão, o Trolox, que é um análogo hidrossolúvel da vitamina E, assim, os resultados dos diferentes métodos podem ser expressos igualmente em equivalentes de Trolox.

7.2.1. DPPH (2,2 DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL)

O teste de DPPH é um dos métodos indiretos mais antigos para se determinar a atividade antioxidante. Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo este radical à hidrazina. O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 515-520 nm. A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado em sua molécula, que confere uma coloração púrpura (violeta), caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 515-517 nm. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada à uma solução de DPPH, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarelo pálida, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma, ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A diferença entre essas absorbâncias gera valores que permitem definir a atividade antioxidante, sendo que uma absorbância baixa indica atividade sequestrante de radicais livres.

Portanto, a avaliação da atividade antioxidante ocorre através do monitoramento do consumo do radical livre DPPH, através da medida do decréscimo das respectivas medidas de absorbância. A capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação, é evidenciada pela porcentagem de DPPH restante no sistema.

A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH. remanescente no meio reacional. A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (IC_{50}), também denominada de concentração inibitória (IC_{50}). Assim, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC_{50} e maior será a sua atividade antioxidante.

Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais, mas

por ser um método colorimétrico não é muito aplicado para substâncias coloridas devido a interferências por pigmentos.

Materiais e reagentes

Tubos Falcon de 15 mL, pipetas de 200 µL, pipetas de 5000 µL, espátula, balão volumétrico de 10, 50 e 100 mL, béquer, agitador de tubos, balança analítica, crônometro digital, cubetas de quartzo, espectrofotômetro, provetas de 10 e 50 mL, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), álcool metílico p.a., Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico).

Procedimento

1. Pipetar 100 µL do extrato da amostra em tubo de Falcon de 10 mL, e adicionar 3,9 mL da solução de trabalho de DPPH 0,06 mM, para completar o volume de 4 mL.

2. Homogeneizar a mistura em vórtex por 30 segundos, deixar em repouso por 60 minutos no escuro, e fazer a leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm.

3. Fazer um branco, utilizando o mesmo procedimento substituindo o volume do extrato por 100 µL do mesmo solvente utilizado na diluição do extrato da amostra.

Obs. Zerar o aparelho com o mesmo solvente utilizado na diluição do extrato.

Cálculo

Expressão da atividade antioxidante em % de inibição do radical dpph

Exemplo

Se a leitura da absorbância do branco fosse 0,85 e da amostra de 0,25, a diferença na queda da absorbância seria de 0,60. Se a diferença da absorbância fosse de 0,85, isso implicaria em 100% de inibição, assim a diferença de 0,60 corresponde a 70,59 % (0,60 x 100 / 0,85) de inibição. Este percentual de inibição está relacionado com a quantidade de amostra presente nos 100 µL do extrato, o qual está diluído nos 4 mL da solução reagente. Portanto, para se comparar o % de inibição entre amostras, se deve ter extratos com as mesmas concentrações.

Também pode se utilizar a fórmula

% de inibição (% AA) = [(Abs branco – Abs amostra) / (Abs branco)] x 100

Onde, Abs = absorbância.

Expressão da atividade antioxidante em µmol trolox equivalentes / g amostra

Para isso deve-se utilizar a equação da curva de calibração do padrão de Trolox. Tendo o valor da absorbância da amostra, pela equação encontra-se a respectiva concentração em µM TEAC, ou $\mu mol.L^{-1}$, sendo a capacidade antioxidante equivalente a Trolox relativa, o que se relaciona com a quantidade de amostra, expressando o resultado em $\mu mol.g^{-1}$ de amostra.

Exemplo

Se o extrato original continha 5,2080 g de amostra diluída em 50 mL, e deste foi removido os 100 µL para colocar com 3,9 mL da solução reagente, teria então nestes 4 mL da solução reagente 0,010416 g (5,2080 g x 0,1 mL / 50 mL) de amostra. A absorbância desta solução foi de 0,646 e do branco 0,152, assim a absorbância da amostra ficaria de 0,494 (0,646 - 0,152). Tendo como equação da reta y = 0,09754 x + 0,0777, a concentração

obtida pelo valor da absorbância seria 4,268 µM (0,494 - 0,0777 / 0,09754), ou seja, 4,268 µmol.L^{-1} de trolox. Nos 4 mL da solução reagente teria 0,017072 µmol (4,268 µmol x 4 mL / 1000 mL) de trolox, nos quais tem 0,010416 g de amostra. Assim para 1 g de amostra teria 1,639 µmol (0,017072 µmol x 1 g / 0,010416 g) de TEAC.g^{-1} de amostra ou 1.639 mmol de TEAC.g^{-1} de amostra.

Também se pode calcular pelo fator de diluição.

Inicialmente se tinha 0,10416 g / mL (5,2080 g / 50 mL), de onde se retirou 100 µL (0,010416 g), e se diluiu a 4 mL, tendo então 0,002604 g / mL (0,010416 g / 4 mL). Assim, a solução foi diluída 40 vezes (0,10416 g / 0,002604 g), e a amostra inicial estava diluída 50 vezes, perfazendo uma diluição de 2000 vezes. Portanto, multiplicando o valor encontrado pela equação (4,268 µmol / L ou 0,004268 µmol / mL) por 2000 vezes, se obtém 8,536 µmol no volume inicial, o qual contêm 5,2080 g de amostra, o que equivale a 1,639 µmol.g^{-1} (8,536 µmol x 1 g / 5,2080 g) de amostra.

Ou ainda, se pode calcular pelo fator de diluição parcial.

Multiplicando o valor encontrado pela equação (4,268 µmol / L) pela diluição de 40 vezes, se obtém 170,72 µmol / L no volume inicial de 50 mL. Assim, nos 50 mL teria 8,536 µmol (170,72 µmol x 50 mL / 1000 mL), nos quais contêm 5,2080 g de amostra, o que equivale a 1,639 µmol.g^{-1} (8,536 µmol x 1 g / 5,2080 g) de amostra.

7.2.2. ABTS [(2,2-AZINO-BIS (3-ETHYLBENZOTHIAZOLINE-6-SULPHONIC ACID)]

Este também é um dos métodos mais usados, altamente sensível, preciso, rápido, simples e econômico, podendo ser utilizado tanto para compostos solúveis em água (hidrofílicos) quanto para compostos solúveis em solventes orgânicos (lipofílicos).

Por este método se avalia a capacidade relativa das substâncias antioxidantes em descolorir o cátion radical 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiozolino- 6- ácido sulfônico) ($ABTS^{+}$) através da sua captura. Desse modo, a redução da cor do radical é acompanhada pela diminuição da absorbância a 734 nm.

O antioxidante sintético Trolox (ácido 2- carboxílico -6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametilcromano), solúvel em água, é usado como padrão de comparação. A atividade dos compostos testados é expressa em valores TEAC (Capacidade antioxidante Trolox equivalente), que é definido como a concentração de Trolox que possui a mesma atividade que 1 mmol / L da substância antioxidante investigada.

Assim, a TEAC fornece uma estimativa da quantidade de moléculas de radicais consumidas pelo antioxidante. O valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com ABTS, bem como em inibir processos oxidativos.

Materiais e reagentes

Agitador de tubos de ensaio, balança analítica, balões volumétricos, cronômetro digital, cubetas, espectrofotômetro, provetas, ABTS (2,2 azino bis (ácido 3-etilbenzotiazolina- 6 sulfônico) sal de diamônio, etanol, persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) 140 mM, Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- ácido carboxílico).

Procedimento

1. Preparar a solução de trabalho de ABTS, adicionando 5 mL de solução de ABTS 7 mM em um tubo de Falcon e 88 µL de persulfato de potássio 140 mM. Manter a mistura na ausência de luz, à temperatura ambiente por 16 h.

2. Diluir 1 mL da mistura em metanol até obter a absorbância de 1,410 ± 0,010 a 734 nm.

3. Pipetar 100 µL do extrato da amostra em tubo de Falcon e adicionar 3,9 mL de solução de ABTS, homogeneizar e deixar por 6 minutos, e após ler em espectrofotômetro no comprimento de onda de 734 nm.

4. Fazer um branco utilizando o mesmo procedimento substituindo o volume de extrato por metanol.

Obs. Zerar o aparelho com metanol.

Cálculo

Para isso deve-se utilizar a equação da curva de calibração do padrão de Trolox. Ao final, plotar um gráfico do percentual de inibição das concentrações em µM de Trolox (eixo x) versus absorbância (eixo y), e traçar a equação de regressão da curva (y = ax + b). Tendo o valor da absorbância da amostra, pela equação encontra-se a respectiva concentração em µmol TEAC.g^{-1} amostra, sendo a capacidade antioxidante equivalente a Trolox relativa.

Exemplo

Realizar o mesmo procedimento efetuado para o cálculo em µmol TEAC.g $^{-1}$ amostra no DPPH, utilizando no cálculo as devidas diluições.

7.2.3. FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER)

Esse é um método simples, rápido e de baixo custo. O método fundamenta-se nas reações redox que ocorre com o Fe^{3+} que é reduzido a Fe^{2+} em meio ácido. A quantidade de ferro reduzido (Fe^{3+} a Fe^{+2}) pode ser relacionada a quantidade de antioxidantes, e evidenciada por meio da absorbância.

O complexo $[Fe^{3+}(TPTZ)_2]^{3+}$ inicial quando reage com uma substância antioxidante redutora em um meio ácido, recebe um elétron e reduz-se a $[Fe^{2+}(TPTZ)_2]^{2+}$. Este ensaio deve ocorrer em condições ácidas, porque o pH tem efeito importante na redução da capacidade de antioxidantes. A absorbância é medida a 593 nm devido à formação ao composto de cor azul intenso (Fe^{2+}) a partir do complexo oxidado incolor (Fe^{3+}), pela ação de antioxidantes doadores de elétrons. Quanto maior a absorbância maior é o efeito antioxidante. A técnica é limitada ao meio aquoso e às substâncias que tenham menor capacidade de redução que o próprio íon férrico, para não contribuir com o aumento do FRAP.

Materiais e reagentes

Tampão de acetato de sódio trihidratado 0,3 M, solução de acetona 70%, ácido acético glacial p.a., solução de ácido clorídrico 40 mM, solução de álcool metílico a 50%, solução de cloreto férrico hexahidratado 20 mM, solução de sulfato ferroso heptahidratado 2 mM, solução TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM, agitador de tubos de ensaio, balança analítica, balão volumétrico de 10 mL, 50 mL e 1000 mL, banho-

maria, cubetas, espectrofotômetro, pipeta automática (10 µL – 1.000 µL), proveta de 50 mL, tubos de ensaio com tampa.

Procedimento

1. Pipetar 90 µL de extrato em tubo de Falcon de 15 mL, acrescentar 270 µL de água destilada e 2,7 mL da solução do reagente FRAP.

2. Homogeneizar em agitador de tubos e levar ao banho maria a 37º C, mantendo por 30 minutos.

3. Fazer a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

4. Fazer um branco utilizando o mesmo procedimento substituindo o volume de extrato pelo mesmo solvente utilizado no extrato.

Obs. Zerar o aparelho com água.

Cálculo

Para isso deve-se utilizar a equação da curva de calibração do padrão de Trolox. Ao final, plotar um gráfico do percentual de inibição das concentrações em µM de Trolox (eixo x) versus absorbância (eixo y), e traçar a equação da curva: y = ax + b. Tendo o valor da absorbância da amostra, pela equação encontra-se a respectiva concentração em µmol TEAC.g^{-1} amostra, sendo a capacidade antioxidante equivalente a Trolox relativa.

Exemplo

Realizar o mesmo procedimento efetuado para o cálculo em µmol TEAC.g^{-1} amostra no DPPH, utilizando no cálculo as devidas diluições.

7.2.4. ORAC (OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY)

O método ORAC utiliza os radicais peroxila como substâncias pró-oxidantes, geradas a partir do azo-iniciador AAPH [dihidrocloreto de 2,2'- azobis (2-amidinopropano)], e como substrato tem-se a fluoresceína.

O antioxidante adicionado (da amostra) reage rapidamente com os radicais, doando átomos de hidrogênio, inibindo a perda da intensidade da fluorescência, que é proporcional à atividade antioxidante. Neste ensaio o radical peroxil, gerado pela reação do AAPH com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente para formar um produto não fluorescente, que pode ser medido por espectrofotometria. As substâncias antioxidantes na amostra, são responsáveis pela proteção da fluoresceína da degradação (oxidação) ocasionada pelo radical peroxil, ou seja, quando maior a atividade antioxidante, menor será a alteração da fluorescência.

O método ORAC possui uma vantagem muito importante com relação aos outros métodos de determinação da capacidade antioxidante que usam a absorbância, por utilizar a fluorescência como medida do dano oxidativo, e assim, ocorre menor interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras. Além disto, este método pode medir a atividade antioxidante dos componentes hidrofílicos e lipofílicos de uma amostra, usando ciclodextrina metilada, que aumenta a solubilidade em água dos compostos lipossolúveis, pois é uma molécula anfifática.

Este ensaio avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio. Assim, a

atividade antioxidante de uma dada substância é determinada através da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco, medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo.

Usando-se Trolox de concentrações conhecidas, uma curva padrão é gerada e a atividade ORAC da amostra é calculada. O resultado é expresso em unidade de ORAC ou equivalentes de Trolox, o qual corresponde à quantidade de Trolox em micromols que tem a mesma atividade antioxidante de um litro da solução testada.

Materiais e reagentes

AAPH (dihidrocloreto de 2,2'-azobis [2-metilpropionamida]), fluoresceína (3', 6'-dihidroxipiro [isobenzofurano-1 [3H], 9' [9H]-xanteno]-3-ona), solução tampão fosfato, Trolox, balança analítica, cubetas de quartzo, espectrofluorímetro, béquer, tubos de ensaio, balões volumétricos.

Procedimento

1. Adicionar 250 µL do extrato de amostra em tubo de Falcon de 5 mL, acrescentar 1500 µL de solução de fluoresceína 4 nM, e manter sob proteção da luz a 37 °C em banho maria.

2. Após adicionar 250 µL de solução de AAPH (160 mM), e imediatamente fazer a leitura da intensidade de fluorescência, em fluorímetro, no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 515 nm.

3. Realizar as leituras durante 30 minutos, em intervalos de 1 minuto, e após os 30 minutos de leitura da amostra, a intensidade de fluoresceína deve ser menor que 10% do seu valor inicial. Caso isso não ocorra, é necessário ajustar a concentração da solução a ser analisada.

4. Fazer o mesmo procedimento, substituindo o extrato pela solução tampão de fosfato.

Cálculo

O cálculo deve ser realizado a partir de uma curva padrão de Trolox em solução tampão de fosfato, plotando em um gráfico da área líquida ($AUC_{líquida}$) no eixo Y x concentração no eixo X, para obter a equação da reta.

Após calcular a área líquida da amostra ($AUC_{líquida}$ - AUC_{branco}), introduzir o valor na equação da reta para obter o resultado da atividade antioxidante expressando-a em equivalente Trolox em µmol TEAC.g^{-1} amostra.

Obs. A área líquida da amostra é calculada descontando-se o valor de AUC da amostra pelo valor do branco (Área Líquida = $AUC_{amostra}$ - AUC_{branco}).

Exemplo

Realizar o mesmo procedimento efetuado para o cálculo em µmol TEAC.g^{-1} amostra no DPPH, utilizando no cálculo as devidas diluições.

7.3. DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C

A vitamina C é um composto hidrossolúvel e termolábil, que pode ser sintetizado pelas plantas e pelos tecidos da maioria das espécies animais. A forma ativa da vitamina C é o ácido L. ascórbico, que pode estar na forma reduzida ou oxidada na forma do ácido dehidroascórbico. O ácido ascórbico tem a capacidade de ceder e receber elétrons, o que lhe confere um papel essencial como antioxidante.

Materiais e reagentes

Balança analítica, vidraria comum de laboratório, solução de iodo 0,01 N, solução de tiossulfato de sódio 0,01 N, solução de amido 0,5% (m/v), solução de ácido sulfúrico 12 N.

Procedimento

1. Extrair 100 mL de suco da amostra e filtrar, após pipetar 20 mL do suco e colocar em erlemeyer de 125 mL.

2. Adicionar 3 mL de ácido sulfúrico 12 N para reduzir o pH, e 3 mL de amido como indicador (formação de cor azul pela reação entre o amido e o iodo em presença de iodeto).

3. Titular com solução de iodo 0,01 N até aparecimento de cor escura, deixando um excesso de 1 mL.

4. Titular com tiossulfato de sódio 0,01 N até desaparecimento da cor escura, colocando 1 mL de excesso.

5. Titular novamente com solução de iodo 0,01 N até aparecimento da cor preta.

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade total de equivalentes gramas de iodo gastos na titulação (volume gasto do iodo - volume gasto do tiossulfato), que corresponde a quantidade de equivalentes gramas de vitamina C presente na amostra, expressando o resultado em mg Vitamina C / 100 mL de amostra.

Exemplo

Se ao titular 20 mL de suco de laranja, gastou-se 15,2 mL de solução de iodo 0,01 N (total do volume de iodo - volume de tiossulfato), a quantidade de vitamina C em mg / 100 mL de suco será (considerando o fator de correção 1,00 para ambas as soluções, caso contrário deve-se multiplicar o fator de correção pelo volume de cada uma das soluções):

Em 5,2 mL de solução de iodo se tem (15,2 mL x 0,01 eqg / 1000 mL) 0,000152 eqg de iodo; portanto, se tem a mesma quantidade de vitamina C em 20 mL de suco, ou seja, 0,000152 eqg de vitamina C.

Como 1 eqg de vitamina C tem 88 g; assim, se tem (0,000152 eqg x 88 g / 1 eqg) 0,013337 g ou 13,34 mg de vitamina C em 20 mL de suco. Portanto, se tem (13,34 mg x 100 mL / 20 mL) 66,69 mg de vitamina C em 100 mL de suco.

Também pode ser utilizado a fórmula

Ácido ascórbico (mg.100 mL^{-1} de suco) = [(V x f) - (v x f)] x 0,88 x 100 / mL

Onde, V = Volume total da solução de iodo, v = volume da solução de tiossulfato, mL = volume de amostra, f = fator de correção das respectivas soluções.

7.4. DIGESTÃO *IN VITRO*

A metodologia da digestão *in vitro* procura simular o que ocorreria no processo digestivo humano, em termos de liberação de substâncias bioativas no estômago e no intestino, os quais ficam então disponíveis para serem absorvidos pelo organismo humano. Na técnica são utilizadas enzimas presentes no organismo envolvidas no processo de digestão, com as amilases, pepsinases e lipases, e alterações de pH com o uso de tampões, simulando o pH ácido do estômago e o pH alcalino dos intestinos.

Materiais e reagentes

Cloreto de sódio, hidróxido de sódio 50% (m/v), cloreto de potássio, hidrogeno fosfato de sódio, hidrogeno carbonato de sódio, cloreto de amônio, uréia, cloreto de magnésio, ácido clorídrico, pepsina, pancreatina, sais biliares.

Procedimento

1. Preparar as soluções de suco gástrico, suco intestinal e de sais biliares.

2. Pesar cerca de 8 g de amostra, para cada um dos diferentes intervalos de tempo de digestão (0, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos).

3. Simular a digestão gástrica adicionando 12 mL de suco gástrico a cada amostra e incubar a 37 ºC por 2 h, sob agitação orbital a 120 rpm.

4. Simular a digestão intestinal pela adição de 12 mL de suco intestinal e 6 mL de suco biliar, sendo mantida a agitação por mais 4 h.

5. Remover as alíquotas em cada tempo de análise, para a quantificação do composto bioativo.

Cálculo

Se baseia na quantidade do composto bioativo liberado no processo de digestão gástrica ou intestinal, em relação a quantidade total do composto incorporado, expressando resultado em % (m/m).

Exemplo

Se em um determinado produto alimentício foi adicionado extratos encapsulados de um fruto com a proporção de 87 $mg.g^{-1}$ de compostos fenólicos nas cápsulas, e a proporção de cápsulas no produto alimentício foi de 5% (m/m). A cada 100 g de produto tinha 5 g de cápsulas, as quais continham 435 mg (87 mg x 5 g / 1 g) de compostos fenólicos. Se no tempo de 360 minutos foi encontrado 0,76 mg de compostos fenólicos, isto equivale a 0,1747 %, m/m (0,76 mg x 100 / 435 mg) de compostos fenólicos liberados. Se faz este mesmo cálculo para cada um dos períodos em que foram coletas as alíquotas, e se traça um gráfico do % de composto bioativo liberado (eixo y) em relação ao tempo de digestão em minutos (eixo x), assim se tem a noção da liberação do composto tanto no meio gástrico quanto intestinal.

Também pode se utilizar a fórmula

Liberação % (m/m) = (composto bioativo liberado) / (total de compostos bioativos encapsulados) x 100

CAPÍTULO

08 Soluções, indicadores e curvas padrões utilizadas nas técnicas analíticas

8.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES

Solução de AAPH (dihidrocloreto de 2,2'-azobis [2-metilpropionamida] - $C_8H_{18}N_6.2HCl$) 160 mM

Pesar 4,3398 g de AAPH em béquer, dissolver com cerca de 50 mL de água, transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água.

Solução de ABTS [(ácido 2,2`Azino-bis (3-etilbenzotiazolina -6- sulfônico) - $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$] 7 mM

Pesar 0,1920 g de ABTS em béquer, dissolver com cerca de 25 mL de água, transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água. Transferir para frasco âmbar e armazenar sob refrigeração por no máximo 30 dias.

Solução de acetato de chumbo [$Pb(C_2H_3O_2.3H_2O)$] concentrada

A solubilidade do acetato de chumbo em água a 25°C é de 55,5 g / 100 mL, assim para obter uma solução concentrada, se pesa cerca de 24 g de acetato de chumbo e se dissolve em 50 mL de água (colocar 2-3 gotas de ácido acético para clarear a solução).

Solução de acetato de chumbo [$Pb(C_2H_3O_2.3H_2O)$] saturada

A solubilidade do acetato de chumbo em água a 25 °C é de 55,5 g / 100 mL, assim para obter uma solução saturada, se pesa um pouco mais de 5,55 g de acetato de chumbo e se dissolve em 10 mL de água (colocar 2-3 gotas de ácido acético para clarear a solução).

Solução de acetona (C_3H_6O) 70% (v/v)

Medir em proveta 70 mL de acetona p.a., transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

Solução de acetona (C_3H_6O) 80% (v/v)

Medir em proveta 80 mL de acetona p.a., transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

Solução de ácido acético (CH_3COOH) 1 N

Medir 57,8 mL de solução de ácido acético glacial (99%) com bureta, transferir para balão volumétrico de 1000 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de ácido acético (CH_3COOH) : clorofórmio ($CHCl_3$), 3:2 (v/v)

Medir 60 mL de solução de ácido acético glacial com proveta de 100 mL, transferir para béquer de 250 mL, e adicionar 40 mL de clorofórmio.

Solução de ácido bórico (H_3BO_3) 4% (m/v)

Pesar 4,0 g de ácido bórico em béquer 100 mL, dissolver com aproximadamente 50 mL de água destilada, transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de ácido clorídrico (HCl) 40 mM

Medir 3,3 mL de solução de ácido clorídrico concentrado (37%), transferir para balão volumétrico de 1 L, contendo 500 mL de água, e completar o volume com água.

Solução de ácido clorídrico (HCL) 0,1 N

Medir 8,29 mL de solução de ácido clorídrico concentrado (37%) em bureta de 10 mL e transferir para balão volumétrico de 1000 mL, contendo aproximadamente 500 mL de água destilada, e completar o volume com água.

Solução de ácido clorídrico (HCL) 0,5 N em metanol (solução metanólica)

Medir 4,15 mL de solução de ácido clorídrico concentrado (37%) em bureta de 50 mL e transferir para balão volumétrico de 100 mL, contendo aproximadamente 50 mL de metanol anidro, e completar o volume com metanol anidro.

Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,561 N

Medir 4,69 mL de solução de HCI concentrado (37%) em bureta de 10 mL, transferir para balão volumétrico de 100 mL, contendo aproximadamente 50 mL de água, e completar o volume com água destilada.

Solução de ácido clorídrico (HCl) 1 N

Pipetar 8,29 mL de solução ácido clorídrico concentrado (37%) para balão volumétrico de 100 mL, contendo aproximadamente 50 mL de água destilada, e completar o volume com água.

Solução de ácido clorídrico (HCl) 1+3 (v/v)

Adicionar 100 mL de água em béquer, colocar com proveta 50 mL de ácido clorídrico concentrado, e adicionar mais 50 mL de água destilada.

Solução de ácido clorídrico (HCl) 25+11 (v/v)

Adicionar 11 mL de água em béquer de 50 mL, medir em proveta 25 mL de ácido clorídrico concentrado e misturar à água.

Solução de ácido clorídrico (HCL) 2% (v/v)

Pipetar 2 mL de solução de ácido clorídrico concentrado (37%) para balão volumétrico de 100 mL, contendo aproximadamente 50 mL de água destilada, e completar o volume com água.

Solução de ácido clorídrico (HCL) 5% (v/v)

Pipetar 5 mL de solução de ácido clorídrico concentrado (37%) para balão volumétrico de 100 mL, contendo aproximadamente 50 mL de água destilada, e completar o volume com água.

Solução de ácido nítrico (HNO_3) 1+9 (v/v)

Colocar 90 mL de água em béquer de 250 mL, e adicionar 10 mL de ácido nítrico concentrado (70%).

Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 N

Medir 27,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (97%) com bureta, transferir para balão volumétrico de 1000 mL, contendo 500 mL de água destilada, e completar o volume com água destilada.

Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 N

Medir 5,49 mL de ácido sulfúrico concentrado (97%) com bureta ou pipeta graduada, transferir para balão volumétrico de 100 mL contendo aproximadamente 50 mL de água destilada, e completar o volume com água destilada.

Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 12 N

Medir 329,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (97%) em bureta, transferir para balão volumétrico de 1000 mL, contendo 500 mL de água destilada, e completar o volume com água destilada.

Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1,25% (m/m) ou 0,255 N

Pipetar 7,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (97%) em balão volumétrico de 1000 mL, contendo aproximadamente 500 mL de água destilada, e completar o volume com água destilada.

Solução de ácido tiobarbitúrico ($C_4H_4N_2O_2S$) a 0,75% (m/v) em ácido acético (CH_3COOH)

Pesar 0,75 g de ácido tiobarbitúrico em béquer, adicionar 75 mL de ácido acético glacial e 2 mL de ácido clorídrico concentrado, dissolver, e completar o volume a 100 mL com ácido acético glacial.

Solução de ácido tricloroacético (CL_3CCOOH) 10% (m/v)

Pesar 5 g de ácido tricloroacético em béquer, dissolver com água, transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água.

Solução de água oxigenada : guaiacol 1%, 1:1 (v/v)

Misturar em um béquer 10 mL de água oxigenada 20 V, com 10 mL de solução de guaiacol a 1% (m/v).

Solução de álcool etílico (C_2H_5OH) a 70% a partir de álcool 96% (^0GL)

Medir 72,92 mL de álcool a 96% em proveta, transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de álcool etílico (C_2H_5OH) a 78% (m/v) a partir de álcool 96% (^0GL)

Medir 81,25 mL de álcool a 96% em proveta, transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de álcool etílico (C_2H_5OH) a 95% (m/v) a partir de álcool 96% (^0GL)

Medir 98,96 mL de álcool a 96% em proveta, transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de álcool metílico (CH_3OH) a 50% (v/v)

Medir 50 mL de metanol p.a., transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água.

Solução antiespumante

Álcool n-amílico ou solução de silicone. A solução de silicone é preparada misturando 1 g de silicone em 50 mL de éter etílico e 50 mL de éter de petróleo, após estocar no refrigerador.

Solução carbonato de cálcio ($CaCO_3$) 1,5 N

Pesar 7,5 g de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) em béquer, dissolver com 20 mL de solução de ácido clorídrico 2% (v/v), transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água.

Solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5% (m/v)

Pesar 7,5 g de carbonato de sódio em béquer, dissolver com 50 mL de água, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

Solução de clorofórmio : metanol, 2:1 (v/v)

Adicionar em um béquer de 100 mL, 50 mL de clorofórmio com 25 mL de metanol.

Solução de clorofórmio : metanol, 3:1 (v/v)

Adicionar em um béquer de 100 mL, 60 mL de clorofórmio com 20 mL de metanol.

Solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) 10% (m/v)

Pesar 1 g de cloreto de alumínio ($AlCl_3$), transferir com água para balão volumétrico de 10 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 2 N

Pesar 11,1 g de cloreto de cálcio em béquer, transferir com água para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de cloreto férrico hexahidratado ($FeCl_3.6H_2O$) 20 mM

Pesar 0,5406 g do cloreto férrico em béquer, dissolver com água, transferir para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água. Transferir para um frasco âmbar e armazenar sob refrigeração por no máximo 30 dias.

Solução de cloreto de potássio (KCl) 3% (m/v)

Pesar 3 g de cloreto de potássio, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada.

Solução de cloreto de sódio (NaCl) padrão

Pesar 20 mg de cloreto de sódio em béquer, transferir com água para balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume com água destilada, e fazer diluições para obter concentrações finais de 5,0 a 10,0 mg de cloreto de sódio por litro.

Solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,1 N

Secar 10 g de cloreto de sódio em estufa a 250 ^{0}C / 1 hora, esfriar em dessecador, pesar 585 mg, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada.

Solução de cloreto de sódio (NaCl) saturada

A solubilidade do cloreto de sódio em água a 20 ^{o}C é de 36 g / 100 mL, portanto para preparar uma solução saturada deve-se colocar uma quantidade superior a 3,6 g do sal a cada 10 mL de água.

Solução de cloridrato de hidroxilamina ($NH_2OH.HCl$) 10% (m/v)

Pesar 1,0 g de cloridrato de hidroxilamina em béquer, transferir com água para balão volumétrico de 10 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de cromato de potássio (K_2CrO_4) 5% (m/v)

Pesar 5 g de cromato de potássio p.a. em béquer, dissolver com água destilada, transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de cromato de potássio (K_2CrO_4) 10% (m/v)

Pesar 10 g de cromato de potássio em béquer, dissolver com água destilada, transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de α α`dipiridila ($C_{10}H_8N_2$) a 0,1% (m/v)

Pesar 0,01g de dipiridila (2,2`diperidil) em béquer, transferir com água para balão volumétrico de 10 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) 0,6 mM

Pesar 0,0047 g de DPPH em béquer, dissolver com metanol, transferir para balão volumétrico de 20 mL, e completar o volume com metanol.

Solução de DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) 0,06 mM (solução de trabalho)

Pipetar 10 mL da solução 0,6 mM de DPPH, colocar em balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com metanol. Medir a absorbância em espectrofotômetro desta solução em 517 nm, a qual deve ser de 1,10 ± 0,02 nm (1,08 nm – 1,12 nm). Se necessário, ajustar a concentração adicionando metanol para diluir, ou pela adição da solução 0,6 mM para concentrar a solução.

Solução de éter de petróleo : éter etílico, 1:1 (v/v)

Misturar em um béquer 50 mL de éter de petróleo (mistura de hidrocarbonetos voláteis como pentano, hexano e heptano) e 50 mL de éter etílico ($C_4H_{10}O$).

Solução de éter etílico : álcool etílico, 2+1 (v/v)

Misturar em um béquer 100 mL de éter etílico ($C_4H_{10}O$) com 50 mL de álcool etílico (C_2H_5OH).

Solução de Fehling A

Pesar 34,639 g de sulfato de cobre ($CuSO_4$) em béquer, transferir com água para um balão volumétrico de 1000 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de Fehling B

Pesar 173 g de tartarato de potássio e sódio (sal de Rochelle- $C_4H_4O_6KNa.4H_2O$) e 125 g de hidróxido de potássio (KOH) em béquer, transferir com água para balão volumétrico de 1000 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de ferro (Fe) estoque

Adicionar 1 g de ferro em balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 20 mL de ácido clorídrico concentrado e 50 mL de água, completar o volume com água.

Solução de ferro (Fe) padrão

Pipetar 2 mL de solução estoque de ferro em balão volumétrico de 200 mL, adicionar 4 mL de ácido clorídrico concentrado, e completar o volume com água.

Obs. 1 mL da solução = 0,01 mg de Fe.

Solução (reagente) de Folin-Ciocalteau

Dissolver 10 g de tungstato de sódio ($Na_2WO_4.2H_2O$) e 2,0 g ácido fosfomolibdênico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), em uma solução mista de 75 mL de água e 5 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) a 85% (v/v), em balão de 500 mL. Conectar no condensador de refluxo e deixar ferver por 2 horas. Esfriar, filtrar em balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água, e após armazenar em garrafa âmbar.

Solução (reagente) de Folin-Ciocalteau 0,25 N a partir de solução (reagente) de Folin-Ciocalteau 2 N (solução comercial)

Pipeta 12,5 mL de solução de Folin 2 N, colocar em balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água. Transferir para um vidro âmbar ou protegido da luz, e armazenar sob refrigeração no máximo por até um mês.

Solução de fluorosceína ($C_{20}H_{12}O_5$) 1 mM

Pesar 0,0167 g de fluorosceína em béquer, dissolver com solução tampão de fosfato (pH 7,4), transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com a solução tampão de fosfato. Transferir para frasco âmbar, estocar sob refrigeração no máximo por 10 dias.

Solução de fluorosceína ($C_{20}H_{12}O_5$) 4 nM

Pipetar 4 µL da solução de fluoresceína 1 mM e colocar em balão volumétrico de 1000 mL, e completar o volume com a solução tampão de fosfato.

Obs. Utilizar a solução apenas no dia da análise.

Solução de (reagente) FRAP

Pipetar 25 mL de solução tampão de acetato 0,3 M em tubo de ensaio, acrescentar 2,5 mL de solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina - $C_{18}H_{12}N_6$)10 mM e 2,5 mL de solução de cloreto férrico ($FeCl_3$) 20 mM.

Obs. Utilizar imediatamente após sua preparação.

Solução de glicose ($C_6H_{12}O_6$) a 1% (m/v)

Pesar 1 g de glicose, adicionar 25 mL de álcool a 95% e 25 mL de água destilada, dissolver por completo, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada.

Solução de guaiacol ($C_7H_8O_2$) a 1% (m/v)

Pesar 1 g de guaiacol em béquer, dissolver com álcool etílico, transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com álcool etílico.

Solução de hidróxido de amônio (NH_4OH) 1+1 (v/v)

Colocar 50 mL de solução de hidróxido de amônio em béquer, e adicionar 50 mL de água destilada.

Solução de hidróxido de amônio (NH_4OH) 1+50 (v/v)

Colocar 1 mL de solução de hidróxido de amônio em béquer, e adicionar 50 mL de água destilada.

Solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,1 N (solução alcóolica)

Pesar 5,6 g de hidróxido de potássio em béquer, solubilizar com água, transferir com álcool etílico para balão de 100 mL, e completar o volume com álcool etílico.

Solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 N (solução alcóolica)

Pesar 2,8 g de hidróxido de potássio em béquer, solubilizar com água, transferir com álcool etílico para balão de 100 mL, e completar o volume com álcool etílico.

Solução de hidróxido de potássio (KOH) 1,5 N (solução alcóolica)

Pesar 8,4 g de hidróxido de potássio em béquer, solubilizar com álcool etílico, e transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com álcool etílico.

Solução de hidróxido de potássio (KOH) 30% (m/v)

Pesar 30 g de hidróxido de potássio em béquer, dissolver com água, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar com água.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) N/9

Pesar 0,4444 g de hidróxido de sódio em béquer, dissolver em água destilada, transferir para um balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N

Pesar 0,4 g de hidróxido de sódio em béquer, dissolver em água destilada, transferir para um balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 N ou 1 M

Pesar 20,00 g de hidróxido de sódio em béquer, dissolver em água destilada, transferir para um balão volumétrico de 500 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 5 N

Pesar 20 g de NaOH em béquer, dissolver com água destilada (adicionar 3 g de tiossulfato de sódio, quando o período de armazenamento for longo, para evitar a carbonatação), transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 6 N

Pesar 24 g de NaOH em béquer, dissolver com água destilada (adicionar 3 g de tiossulfato de sódio, quando o período de armazenamento for longo, para evitar a carbonatação), transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,25% (m/v) ou 0,313 N

Pesar 12,5 g de NaOH em um béquer, dissolver com água, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 5% (m/v)

Pesar 5 g de NaOH em um béquer, dissolver com água, transferir para um balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10% (m/v)

Pesar 10 g de NaOH em béquer, dissolver com água destilada (adicionar 3 g de tiossulfato de sódio, quando o período de armazenamento for longo, para evitar a carbonatação), transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 50% (m/v)

Pesar 50 g de NaOH em béquer, dissolver com água destilada (adicionar 3 g de tiossulfato de sódio, quando o período de armazenamento for longo, para evitar a carbonatação), transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de iodato de potássio (KIO_3) 0,1 N

Pesar 214 mg de iodato de potássio (KIO_3), transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de iodeto de potássio (KI) 0,1 N

Secar cerca de 20 g de iodeto de potássio (KI) a 110 ^{0}C / 1 hora, esfriar em dessecador; pesar 1,66 g, transferir com água para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada (guardar em frasco âmbar).

Solução de iodeto de potássio (KI) 10% (m/v)

Pesar 10 g de iodeto de potássio, transferir com água para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada (guardar em recipiente âmbar).

Solução de iodeto de potássio (KI) 15% (m/v)

Pesar 15 g de iodeto de potássio, transferir com água para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água destilada (guardar em recipiente âmbar).

Solução de iodeto de potássio (KI) saturada

A solubilidade do iodeto de potássio em água a 25 ^{o}C é de 149 g / 100 mL, portanto para preparar uma solução saturada deve-se colocar uma quantidade superior a 14,9 g a cada 10 mL de água (guardar em recipiente âmbar).

Solução de iodo (I_2) 0,1 N

Pesar 36 g de iodeto de potássio (KI) em béquer, adicionar 12,70 g de iodo puro, dissolver com cerca de 50 mL de água, transferir para balão volumétrico de 1000 mL, e completar o volume com água destilada (guardar em frasco âmbar).

Solução de iodo (I_2) 0,01 N

Pesar 3,6 g de iodeto de potássio (KI) em béquer, adicionar 1,27 g de iodo puro, dissolver com cerca de 50 mL de água, transferir para balão volumétrico de 1000 mL, e completar o volume com água destilada (guardar em frasco âmbar).

Solução (reagente) de Nelson

Pesar 50 g de molibdato de amônio [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$] em béquer de 1000 mL, dissolver em 800 mL de água, transferir para balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 52 mL de ácido sulfúrico concentrado, adicionar 6 g de hidrogênio arseniato de sódio (Na_2HAsO_4) dissolvido em 50 mL de água, e completar o volume com água (deixar no escuro por 48 horas).

Solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) 0,1 N

Pesar 1,699 g de nitrato de prata, transferir com água para balão volumétrico de 100 mL (envolvido com papel alumínio), e completar o volume com água destilada (guardar em frasco âmbar).

Solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) 1% (m/v)

Pesar 0,1 g de nitrato de prata, transferir para balão volumétrico de 10 mL com água, dissolver, e completar o volume com água destilada.

Solução de nitrito de sódio ($NaNO_2$) 5% (m/v)

Pesar 0,5 g de nitrito de sódio ($NaNO_2$), transferir para balão volumétrico de 10 mL com água, e completar o volume com água destilada.

Solução de oxalato de amônio [$(NH_4)_2C_2O_4.H_2O$] saturada

A solubilidade do oxalato de amônio em água a 20 ^{0}C é de 5,5 g / 100 mL, assim se deve pesar acima de 5,5 g de oxalato de amônio, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada.

Solução de permanganato de potássio ($KMnO_4$) 0,1 N

Pesar 316 mg permanganato de potássio, dissolver com água, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

Solução de permanganato de potássio ($KMnO_4$) 1 N

Pesar 3,16 g permanganato de potássio, dissolver com água, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

Solução de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) 140 mM

Pesar 378,4 mg de persulfato de potássio, dissolver em água, transferir para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com água. Homogeneizar, transferir para um frasco âmbar.

Solução de sais biliares

Colocar em um béquer 105,8 mg de cloreto de sódio (NaCl), 7,5 mg de cloreto de potássio (KCl), 115,7 mg de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), 5 mg de ureia ($CO(NH_2)_2$), 600 mg de sais biliares, dissolver com 50 mL de água, adicionar 1,5 mL de ácido clorídrico concentrado, transferir para balão volumétrico, ajustar o pH para 8,2 (± 0,2) com NaOH 50% (m/v), e completar o volume com água.

Solução (reagente) de Somogyi

Pesar 28 g de hidrogeno fosfato de sódio ($NaHPO_4$) em béquer, transferir para balão volumétrico de 1000 mL contendo 700 mL de água. Adicionar 40 g de tartarato duplo de sódio e potássio ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$), 80 mL de solução de sulfato de cobre ($CuSO_4$) a 10% sob constante agitação, 180 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4), e completar o volume com água. Deixar em repouso por 48 horas e filtrar.

Solução do suco (fluído) intestinal

Colocar em um béquer 140 mg de cloreto de sódio (NaCl), 11 mg de cloreto de potássio (KCl), 68 mg de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), 1,6 mg de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), 1 mg de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 2 mg de ureia ($CO(NH_2)_2$), dissolver com 50 mL de água, adicionar 1,8 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl), ajustar o pH para 8,1 (± 0,2) com NaOH 50%, adicionar 180 mg de pancreatina, transferir para balão volumétrico e completar o volume com água.

Solução do suco (fluído) gástrico

Colocar em um béquer 55 mg de cloreto de sódio (NaCl), 16 mg de cloreto de potássio (KCl), 5 mg de fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4), 8 mg de cloreto de cálcio (CaCl2), 6 mg de cloreto de amônio (NH_4Cl), 2 mg de ureia ($CO(NH_2)_2$), dissolver com 50 mL de água, adicionar 65 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado, ajustar o pH para 1,3

(± 0,2), adicionar 50 mg de pepsina, transferir para balão volumétrico e completar o volume com água.

Solução de sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$) 10 % (m/v)

Pesar 10 g de sulfato de cobre em béquer, dissolver com cerca de 50 mL de água, e completar o volume com água destilada.

Solução de sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4.7H_2O$) 2 mM

Pesar 0,0278 g do sulfato ferroso em béquer, dissolver com água, transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água. Transferir para um frasco âmbar, utilizar apenas no dia da análise.

Solução sulfocrômica

Pesar 20 g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em béquer, dissolver com pouco de água, deixar em banho a frio, adicionar 17 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, completar cuidadosamente o volume até 100 mL com água destilada.

Solução tampão de acetato de sódio (CH_3COONa) 0,3 M (pH 3,6)

Pesar 0,31 g de acetato de sódio em béquer, adicionar 16 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH), transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água. Homogeneizar, transferir para um frasco âmbar.

Solução tampão de acetato (CH_3COONa) : ácido acético (CH_3COOH)

Secar cerca de 10 g de acetato de sódio em estufa a 100 ^{0}C / 1 hora, pesar 8,3 g de acetato em béquer, transferir com água para balão volumétrico de 100 mL, adicionar 12 mL de ácido acético glacial, e completar o volume com água destilada.

Solução tampão MES (2-N-Morfolino etanossulfônico) : TRIS (Tris-hidrometil aminometano), 0,05 M : 0,05 M (pH 8,2 a 24 ^{0}C)

Pesar 19,52 g de MES ($C_6H_{13}NO_4S$) e 12,2 g de TRIS ($C_4H_{11}NO_3$) em béquer de 2000 mL, dissolver com 1,7 L de água, ajustar o pH em 8,2 com NaOH 6 N, transferir para balão volumétrico de 2 L, e completar o volume com água destilada. Se a temperatura do tampão estiver em 20 ^{0}C, ajustar o pH em 8,3; se a temperatura estiver em 28 ^{0}C, ajustar o pH em 8,1; para desvios entre 20 e 28 ^{0}C, ajustar por interpolação.

Solução tampão de fosfato 75 mM (pH 7,4)

Pesar 2,622 g de fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) e 7,950g de fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4) em béquer com 800 mL de água. Ajustar o pH 7,4 com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M, transferir para balão volumétrico de 1 L, completar o volume com água, filtrar. Deixar sob refrigeração no máximo por 30 dias.

Solução de tiossulfato de sódio ($NA_2S_2O_3.5H_2O$) 0,005 N

Pesar 1,215 g de tiossulfato de sódio em béquer, adicionar 0,025 g de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3), transferir com água destilada e fervida para balão volumétrico de 1000 mL (envolvido com papel alumínio), dissolver, completar o volume com água destilada, transferir para frasco âmbar, aguardar 24 horas e filtrar.

Solução de tiossulfato de sódio ($NA_2S_2O_3.5H_2O$) 0,01 N

Pesar 2,43 g de tiossulfato de sódio em béquer, adicionar 0,025 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) anidro, transferir com água destilada e fervida para balão volumétrico de 1000 mL (envolvido com papel alumínio), dissolver, completar o volume com água destilada. Transferir para frasco âmbar, aguardar 24 horas, filtrar e padronizar.

Solução de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) 0,1 N

Pesar 2,43 g de tiossulfato de sódio em béquer, adicionar 0,025 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) anidro, transferir com água destilada e fervida para balão volumétrico de 100 mL (envolvido com papel alumínio), dissolver, completar o volume com água destilada. Transferir para frasco âmbar, aguardar 24 horas, filtrar e padronizar.

Solução de TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina - $C_{18}H_{12}N_6$) 10 mM

Pesar 0,3124 g de TPTZ em béquer, dissolver com 2 mL de solução de HCL 40 mM, transferir para balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com solução de HCl 40 mM. Transferir para um frasco âmbar e armazenar sob refrigeração no máximo por 30 dias.

Solução de Trolox (ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico - $C_{14}H_{18}O_4$) 2000 µM

Pesar 25 mg de Trolox, dissolver em álcool metílico, transferir para balão volumétrico de 50 mL, e completar o volume com álcool metílico, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar.

Obs. Preparar esta solução, e utilizar apenas no dia da análise.

8.2. PADRONIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas utilizadas do composto padrão, que corresponde a quantidade de equivalentes gramas da solução a ser padronizada. Usualmente a solução a ser padronizada é colocada na bureta, então os equivalentes gramas do titulado (composto padrão) correspondem aos mesmos equivalentes gramas presentes no volume da solução a ser padronizada. Após relacionam-se os equivalentes gramas da solução a ser padronizada que teria em 1000 mL de solução, o que corresponde à normalidade real desta solução. O fator de correção é calculado com base em seu conceito: fator de correção = fator que multiplica a normalidade da solução preparada, para se obter a normalidade real da solução.

Padronização da solução de ácido clorídrico (HCL) 0,1 N

1. Secar cerca de 10 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3), a 250 ^{0}C por 1 hora.

2. Pesar 5,299 g de carbonato de sódio seco em béquer, dissolver em água destilada, transferir para balão volumétrico de 1000 mL, e completar o volume com água.

3. Pipetar 40 mL de solução de carbonato de sódio em erlenmeyer de 250 mL, adicionar 3 gotas de solução de vermelho de metila 0,1% (m/v), e titular com solução de ácido clorídrico 0,1 N, até viragem para a coloração rósea.

4. Aquecer à ebulição para eliminar o gás carbônico, esfriar e prosseguir a titulação até coloração rósea permanente.

Cálculo

O cálculo baseia-se na quantidade de equivalente-grama de carbonato de sódio, que corresponde à quantidade de equivalente-grama de ácido presentes no volume da solução ácida utilizada na titulação (a ser padronizada). Relaciona-se aos equivalentes gramas de ácido que teria em 1000 mL de solução, que corresponde à normalidade da solução. O fator de correção é calculado com base em seu conceito: fator de correção = fator que multiplica a normalidade da solução preparada, para se obter a normalidade real da solução.

Exemplo

Ao padronizar uma solução de ácido clorídrico 0,1 N, gastou-se 40,5 mL de solução do ácido sobre 40 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3), que se preparou colocando 5,3010 g de carbonato em 1 L de água. O equivalente grama do carbonato de sódio é 53 g (106 g / 2). No erlenmeyer havia 40 mL de carbonato, ou seja, 0,21204 g de carbonato (5,3010 g x 40 mL / 1000 mL). Assim, a quantidade de carbonato em equivalentes gramas que reagiu foi de 0,004000755 eqg (0,21204 g x 1 eqg / 53 g). Portanto, em 40,5 mL de ácido tem 0,004000755 eqg de ácido, assim em 1000 mL de solução teria 0,098784 eqg do ácido (1000 mL x 0,004000755 eqg / 40,5 mL), o que equivale a 0,098784 N. Então o fator de correção é 0,098784 N / 0,1 N = 0,9878.

Também se pode utilizar a fórmula

f (fator de correção) = [P x 1000] / [V x Eqg x N]

Onde: P = gramas do carbonato de sódio na alíquota, V = volume gasto da solução de HCl 0,1 N, Eqg = equivalente grama do carbonato de sódio, N = normalidade do ácido.

Padronização da solução de Fehling (Fehling A + Fehling B)

1. Pipetar 10 mL de solução de Fehling A e 10 mL de solução de Fehling B, para um erlenmeyer de 250 mL, adicionar 40 mL de água destilada, e aquecer até a ebulição.

2. Começar a titular com a solução de glicose a 1% (m/v), e quando começar a descolorir o azul intenso, adicionar 1-2 gotas de azul de metileno a 1% (m/v).

3. Continuar a titulação (sempre em ebulição) até a solução ficar incolor (fica um residual tijolo no fundo do recipiente).

Cálculo

Se baseia na capacidade do complexo cobre-tartarato da solução de Fehling de reagir com açúcares redutores, onde o Cu^{++} (cor azul) do complexo é reduzido a Cu^{+} na forma de Cu_2O (cor vermelho tijolo). Na titulação com a glicose, o Título é expresso em gramas de glicose equivalente ao volume de solução de Fehling utilizada. Sabe-se que 1 mL de solução de Fehling A + 1 mL de solução de Fehling B reduzem 0,00473 g glicose.

Exemplo

Ao titular 10 mL de solução de Fehling A + 10 mL de solução de Fehling B, com solução de glicose a 1% (m/v), gastou-se 49,5 mL de solução. Em 49,5 mL de solução de glicose a 1% tem 0,495 g de glicose. Portanto, em 10 mL da solução de Fehling A + 10 mL da solução de Fehling B correspondem a 0,495 g de glicose. Assim, em 1 mL de solução de Fehling A + 1 mL de solução de Fehling B equivalem a 0,0495 g (0,495 g x 1 g / 10 mL], o que corresponde ao título da solução de Fehling.

Padronização de solução de hidróxido de potássio alcóolica (KOH) 0,1 N

1. Colocar cerca de 1 g de ácido benzóico em estufa a 105 ^{0}C / 1 h, esfriar em dessecador, pesar 0,405 g em erlenmeyer.

2. Adicionar 25 mL de álcool etílico a 45 ^{0}C, 1-2 gotas de fenolftaleína a 1 % (m/v).

3. Titular com a solução alcóolica do hidróxido de potássio até viragem de cor.

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas do ácido benzóico presentes no erlenmeyer, que corresponde a quantidade de equivalentes gramas presentes no volume da base utilizada na titulação. Relaciona-se aos equivalentes gramas da base que teria em 1000 mL de solução, que corresponde à normalidade da solução. O fator de correção é calculado com base em seu conceito: fator de correção = fator que multiplica a normalidade da solução preparada, para se obter a normalidade real da solução.

Exemplo

Ao padronizar uma solução de hidróxido de potássio 0,1 N, gastou-se 19,1 mL de solução da base sobre 0,2345 g de ácido benzóico. O equivalente grama do ácido benzóico é 122,12 g, assim a quantidade de ácido em equivalentes gramas que reagiu foi de 0,0019202 (0,2345 g x 1 eqg / 122,12 g). Portanto, em 19,1 mL de base tem 0,10054 eqg (0,0019202 eqg x 1000 mL / 19,1 mL) de base, o que equivale a 0,10054 N. Então o fator de correção é 1,0054 (0,10054 N / 0,1 N).

Também se pode utilizar a fórmula

f (fator de correção) = [P x 1000] / [V x Eqg x N]

Onde: P = gramas de biftalato de potássio, V = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação, Eqg = equivalente grama do biftalato de potássio, N = normalidade da solução de hidróxido de sódio.

Padronização de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N

1. Secar em estufa a 120 ^{0}C / 2 horas, cerca de 2 g de biftalato de potássio ($KHC_8H_4O_4$), esfriar, pesar 0,8000 g de biftalato em erlenmeyer de 250 mL.

2. Adicionar aproximadamente 75 mL de água destilada e 4 gotas de solução alcóolica de fenolftaleína a 1% (m/v), e titular com a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N até coloração levemente rósea.

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas do biftalato de potássio presentes no erlenmeyer, que corresponde a quantidade de equivalentes gramas presentes no volume da base utilizada na titulação. Relaciona-se aos equivalentes gramas da base que teria em 1000 mL de solução, que corresponde à normalidade da solução. O fator de correção é calculado com base em seu conceito: fator de correção = fator que multiplica a normalidade da solução preparada, para se obter a normalidade real da solução.

Exemplo

Ao padronizar uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N, gastou-se 39,5 mL de solução da base sobre 0,8231 g de biftalato de potássio. O equivalente grama do biftalato é 188,2 g, assim a quantidade de biftalato em equivalentes gramas que reagiu foi de 0,004374 (0,8231 x 1 eqg / 188,2 g). Portanto, em 39,5 mL de base tem 0,1107 eqg (0,004374 eqg x 1000 mL / 39,5 mL) de base, o que equivale a 0,1107 N. Então o fator de correção é 1,1070 (0,1107 N / 0,1 N).

Também se pode utilizar a fórmula

f (fator de correção) = [P x 1000] / [V x Eqg x N]

Onde: P = gramas de biftalato de potássio, V = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação, Eqg = equivalente grama do biftalato de potássio, N = normalidade da solução de hidróxido de sódio.

Padronização da solução de iodeto de potássio (KI) 0,1 N

1. Adicionar em erlenmeyer de 250 mL, 20 mL de solução de iodeto de potássio, acrescentar 40 mL de ácido clorídrico concentrado e 50 mL de clorofórmio.

2. Titular com solução de iodato de potássio (KIO_3) 0,1 N até perda de coloração roxa (deve ser estável por 2 minutos).

Cálculo

1 mL de solução de KIO_3 0,1 N = 8,3 mg de KI

Exemplo

Ao padronizar uma solução de iodeto de potássio 0,1 N, gastou-se 39,5 mL de solução de iodato de potássio 0,1 N (fc = 1,0000). Como 1 mL de solução de KIO_3 0,1 N = 8,3 mg de KI, nos 39,5 mL gastos se tem a equivalência de 0,32785 g de KI (40 mL x 8,3 mg). Portanto, se tem 0,32785 g de KI em 20 mL da solução de KI, assim em 1000 mL de solução teria 16,3925 g (0,32785 g x 1000 mL / 20 mL) de KI. Como o peso molecular do

KI é 166 g, teria a normalidade de 0,09875 N (16,3925 g x 0,1 N / 16,6 g). Então o fator de correção 0,9875 (0,09875 N / 0,1 N).

Padronização da solução de iodo (I_2) 0,1 N

1. Pipetar 20 mL da solução de iodo em um Erlenmeyer.

2. Titular com solução de tiossulfato de sódio 0,1 N. Quando a solução ficar amarelo palha, adicionar 2 mL de amido 1% (m/v) como indicador, no ponto final fica incolor.

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas do tiossulfato de sódio gastos na titulação, que corresponde a quantidade de equivalentes gramas presentes no volume da solução de iodo. Relaciona-se aos equivalentes gramas de iodo que teria em 1000 mL de solução, que corresponde à normalidade da solução. O fator de correção é calculado com base em seu conceito: fator de correção = fator que multiplica a normalidade da solução preparada, para se obter a normalidade real da solução.

Exemplo

Ao padronizar 20 mL de uma solução de iodo 0,1 N, gastou-se 20,4 mL de solução de tiossulfato de sódio 0,1 N (fc = 1,0000). Em 20,4 mL de solução de tiossulfato se tem 0,00204 eqg de tiossulfato (20,4 mL x 0,1 eqg / 1000 mL), então se tem a mesma quantidade em equivalentes gramas de iodo nos 20 mL de solução de iodo. Portanto, em 20 mL de solução de iodo tem 0,00204 eqg de iodo, e em 1000 mL teria 0,1020 eqg (0,00204 eqg x 1000 mL / 20 mL), o que equivale a 0,1020 N. Então o fator de correção é 1,0200 (0,1020 N / 0,1 N).

Também se pode utilizar a fórmula

f (fator de correção) = (V x f) / Volume da solução de iodo

Onde, V = volume gasto na titulação, f = fator de correção da solução de tiossulfato.

Padronização da solução de iodo (I_2) 0,01 N

1. Pipetar 20 mL da solução de iodo em um Erlenmeyer.

2. Titular com solução de tiossulfato de sódio 0,01 N. Quando a solução ficar amarelo palha, adicionar 2 mL de amido 1% (m/v) como indicador, no ponto final fica incolor.

Cálculo

Realizar o mesmo procedimento efetuado para a padronização da solução de iodo 0,1 N, levando em consideração que a solução 0,01 N contém 0,01 eqg de iodo em 100 mL de solução.

Padronização da solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) 0,1 N

1. Adicionar em erlenmeyer com 50 mL de água destilada, 1 mL de solução indicadora de cromato de potássio e 25 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 N. Verificar que o pH fique entre 6,5 - 10,5. Se necessário neutralizar com bicarbonato de sódio ou acidificar com solução de ácido nítrico.

2. Titular com solução de nitrato de prata 0,1 N até alterar a cor de branco turvo para marrom avermelhado.

Cálculo

O cálculo se baseia na quantidade de equivalentes gramas do cloreto de sódio utilizados na titulação, que corresponde a quantidade de equivalentes gramas no volume gasto de nitrato de prata. Relaciona-se aos equivalentes gramas de nitrato de prata que teria em 1000 mL de solução, que corresponde à normalidade da solução. O fator de correção é calculado com base em seu conceito: fator de correção = fator que multiplica a normalidade da solução preparada, para se obter a normalidade real da solução.

Exemplo

Ao padronizar 20 mL de uma solução de nitrato de prata 0,1 N, gastou-se 25,4 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 N. Como foi utilizado 25 mL da solução de cloreto de sódio, neste volume tem 0,0025 eqg do sal (0,1 eqg x 25 mL / 1000 mL). Portanto, no volume gasto de nitrato de prata se tem 0,0025 eqg de nitrato de prata. Calculando para 1000 mL, se tem 0,0984 eqg (0,0025 eqg x 1000 mL / 25,4 mL), ou seja, isto equivale a 0,0984 N. Então o fator de correção é 0,9843 (0,0984 N / 0,1 N).

Também se pode utilizar a fórmula

f (fator de correção) = P / (0,0585 x V x N)

Onde, P= gramas de NaCl, V= volume da solução de nitrato de prata, N= normalidade da solução de nitrato de prata.

Padronização da solução de permanganato de potássio ($KMnO_4$) 0,1 N

1. Pesar 0,22 - 0,30 g de ácido oxálico ($H_2C_2O_4.2H_2O$) previamente seco em estufa a 110 ^{0}C por 2 h, dissolver em 60 mL de água destilada e 15 mL de solução de H_2S0_4 (1+8, v/v).

2. Aquecer a 75 - 80 ^{0}C, e titular com a solução de permanganato de potássio.

Cálculo

O cálculo se baseia na oxidação do ácido oxálico em meio ácido pelo permanganato. Se utiliza a proporção na quantidade de equivalentes gramas do ácido oxálico utilizados na titulação, que corresponde a quantidade de equivalentes gramas no volume gasto de permanganato de potássio. Relaciona-se aos equivalentes gramas de permanganato que teria em 1000 mL de solução, que corresponde à normalidade da solução. O fator de correção é calculado com base em seu conceito: fator de correção = fator que multiplica a normalidade da solução preparada, para se obter a normalidade real da solução.

Exemplo

Ao padronizar uma solução de permanganato de potássio 0,1 N, gastou-se 40,6 mL de solução, ao titular sobre 0,2764 g de ácido oxálico. Como foi utilizado 0,2764 g de ácido oxálico, isto equivale a 0,004387 (0,2764 g x 1 eqg / 63 g) eqg do ácido. Portanto, no volume gasto de permanganato se tem 0,004387 eqg de permanganato. Calculando para 1000 mL, se tem 0,1081 eqg (0,004387 eqg x 1000 mL / 40,6 mL), ou seja, isto equivale a 0,1081 N. Então o fator de correção é 1,0810 (0,1081 N / 0,1 N).

Também se pode utilizar a fórmula

f (fator de correção) = [1000 x P] / [V x 6,3025]

Onde, P = gramas de ácido oxálico, V = volume de permanganato gasto na titulação.

Padronização da solução de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 0,1 N

1. Secar 0,5 g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em estufa a 100 ^{0}C / 2 horas, esfriar, pesar 0,20 g de dicromato em erlenmeyer com tampa esmerilhada.

2. Adicionar 80 mL de água destilada contendo 2 g de iodeto de potássio (sob agitação), e mais 20 mL de ácido clorídrico 1 N, e imediatamente colocar no escuro por 10 minutos.

3. Após titular com a solução de tiossulfato, até coloração amarelo claro, então adicionar 1 mL de solução de amido 1% (m/v), e continuar a titulação até o ponto final.

Cálculo

O cálculo se baseia na reação de oxidação, onde o dicromato de potássio oxida o iodeto de potássio liberando iodo, e o iodo formado é titulado com o tiossulfato. Assim, a proporção indireta em equivalentes gramas do permanganato para o tiossulfato é de 1:3. Se utiliza desta proporção na quantidade de equivalentes gramas no volume gasto de tiossulfato de sódio sobre o iodo. Relaciona-se aos equivalentes gramas de tiossulfato que teria em 1000 mL de solução, que corresponde à normalidade da solução. O fator de correção é calculado com base em seu conceito: fator de correção = fator que multiplica a normalidade da solução preparada, para se obter a normalidade real da solução.

Exemplo

Ao padronizar uma solução de tiossulfato de sódio 0,1 N, gastou-se 39,7 mL de solução, ao titular sobre 0,2045 g de permanganato de potássio. Como foi utilizado 0,2045 g de permanganato, isto equivale a 0,00139 eqg (0,2045 g x 1 eqg / 147,09 g). Portanto, utilizando a proporção estequiométrica de 1:3, se tem no volume gasto de tiossulfato 0,004171 eqg de tiossulfato. Calculando para 1000 mL, se tem 0,1051 eqg (0,004171 eqg x 1000 mL / 39,7 mL), ou seja, isto equivale a 0,1051 N. Então o fator de correção é 1,0510 (0,1051 N / 0,1 N).

Também se pode utilizar a fórmula

f (fator de correção) = [g $K_2Cr_2O_7$ x 1000] / [mL $Na_2S_2O_3$ x 49,03]

Padronização da solução de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 0,01 N

1. Secar 0,05 g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em estufa a 100 ^{0}C / 2 horas, esfriar, pesar 0,02 g de dicromato em erlenmeyer com tampa esmerilhada.

2. Adicionar 80 mL de água destilada contendo 0,2 g de iodeto de potássio (sob agitação), e mais 20 mL de ácido clorídrico 0,1 N, e imediatamente colocar no escuro por 10 minutos.

3. Após titular com a solução de tiossulfato, até coloração amarelo claro, então adicionar 1 mL de solução de amido 1%, e continuar a titulação até o ponto final.

Cálculo

Realizar o mesmo procedimento efetuado para a padronização da solução de tiosulfato 0,1 N, levando em consideração que a solução 0,01 N contêm 0,01 eqg de iodo em 1000 mL de solução.

Padronização da solução de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 0,005 N

1. Secar 0,05 g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em estufa a 100 ^{0}C / 2 horas, esfriar, pesar 0,01 g de dicromato em erlenmeyer com tampa esmerilhada.

2. Adicionar 80 mL de água destilada contendo 0,10 g de iodeto de potássio (sob agitação), e mais 10 mL de ácido clorídrico 0,1 N, e imediatamente colocar no escuro por 10 minutos.

3. Após titular com a solução de tiossulfato, até coloração amarelo claro, então adicionar 1 mL de solução de amido 1%, e continuar a titulação até o ponto final.

Cálculo

Realizar o mesmo procedimento efetuado para a padronização da solução de tiosulfato 0,1 N, levando em consideração que a solução 0,005 N contêm 0,005 eqg de iodo em 1000 mL de solução.

8.3. PREPARO DE INDICADORES

Mistura catalítica para proteínas

Peneirar, separadamente, o sulfato de sódio (Na_2SO_4) ou de potássio anidro (K_2SO_4) e o sulfato de cobre penta hidratado ($CuSO_4.5H_2O$) em peneira de malha de 1 mm, juntar 10 g de sulfato de sódio ou de potássio, e 10 g de sulfato de cobre, e misturar.

Solução de alaranjado de metila ou metilorange ou heliantina ou laranja de metilo [$(CH_3)_2NC_6H_4N{:}NC_6H_4SO_3Na$) 0,2 % (m/v)

Pesar 0,2 g de alaranjado de metila em béquer, adicionar 30 mL de água quente, dissolver o indicador, deixar esfriar (se necessário filtrar), transferir para um balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água.

Solução de amido $(C_6H_{10}O_5)_N$ 0,5% (m/v)

Pesar 0,5 g de amido em béquer, adicionar água (apenas para dissolver o amido), colocar 105 mL de água em fervura, deixar ferver por 5 minutos, esfriar (a solução deve ficar transparente) e filtrar com algodão.

Obs. Esta solução dura apenas 24-36 horas sob refrigeração.

Solução de amido $(C_6H_{10}O_5)_N$ 1% (m/v)

Pesar 1 g de amido em béquer, adicionar água (apenas para dissolver o amido), colocar 105 mL de água em fervura, deixar ferver por 5 minutos, esfriar (a solução deve ficar transparente) e filtrar com algodão.

Obs. Esta solução dura apenas 24-36 horas sob refrigeração.

Solução de azul de metileno $(C_6H_{18}CLN_3S.H_2O)$ 1% (m/v)

Pesar 0,5 g de azul de metileno em papel de pesagem, transferir com auxílio de água destilada para balão volumétrico de 50 mL, e completar o volume com água destilada.

Solução de fenolftaleína $(C_{20}H_{14}O_4)$ 1% (m/v)

Pesar 0,1 g de fenolftaleína em béquer, adicionar 5 mL de álcool etílico, dissolver, transferir para um balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com álcool etílico.

Solução indicadora de cromato de potássio (K_2CrO_4)

Pesar 5 g de cromato de potássio e dissolver com 95 mL de água.

Solução indicadora mista

Pesar 0,132 g de vermelho de metila ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) em béquer e dissolver com 70 mL de álcool etílico. Pesar 0,066 g de verde de bromocresol ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) em béquer e dissolver com 70 mL de álcool etílico. Transferir ambas as soluções para balão volumétrico de 200 mL, e completar o volume com álcool etílico. **Obs.** O indicador misto poderá ser incorporado a solução de ácido bórico a 4% (m/v), na proporção de 8 mL por litro.

Solução de Tetrabrometacresolsulfonoftaleína ou verde de bromocresol $(C_{21}H_{14}Br_4O_5S)$ 0,1% (m/v)

Pesar 0,1 g de verde de bromocresol em béquer, adicionar 30 mL de álcool etílico, dissolver, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com álcool etílico.

Solução de vermelho de metila ou vermelho de metilo ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) 0,1% (m/v)

Pesar 0,05 g de vermelho de metila em béquer, adicionar 30 mL de álcool etílico, dissolver o indicador, transferir para um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com álcool etílico.

8.4. CURVAS DE CONCENTRAÇÕES DE PADRÕES

Curva padrão de ácido gálico ($C_7H_6O_5$)

1. Pesar 10 mg de ácido gálico em béquer, dissolver com 5 mL de água, transferir para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com água (solução mãe).

2. Retirar desta solução diferentes alíquotas (50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µL) e levar cada alíquota para balão volumétrico de 10 mL, e completar o volume com água.

3. Em um tubo de Falcon de 5 mL, adicionar 50 µL da solução de concentração conhecida e 250 µL de Folin-Ciocalteau 0,25 N, agitar, e deixar reagir por 8 minutos na ausência de luz.

4. Após adicionar 200 µL de carbonato de sódio 1,5 N e deixar reagir por 90 minutos na ausência de luz.

5. Realizar a leitura em espectrofotômetro em 765 nm.

6. Fazer um branco com uma solução preparada da mesma forma, mas substituindo o volume da solução de ácido gálico por água destilada.

Obs. Zerar o aparelho com água.

Determinação da equação de regressão da curva padrão

Plotar a concentração de ácido gálico em mg (eixo x) versus a absorbância (eixo y) e encontrar a equação de regressão (y = ax + b).

Utilizando 10 mg de ácido gálico em 10 mL, se tem 1 $mg.mL^{-1}$. Ao retirar as alíquotas de 50 a 1500 µL, e completar o volume a 10 mL, se tem 0,005; 0,010, 0,025; 0,050; 0,075; 0,10; 0,125; e 0,15 $mg.mL^{-1}$. Durante o procedimento foi utilizado 50 µL de cada uma das soluções, e misturado com 250 µL de Foling com 200 µL de carbonato, totalizando 500 µL de solução. Assim, se obtem as concentrações na curva (eixo x) de 0,0005; 0,0010; 0,0025; 0,0050; 0,0075; 0,010; 0,0125; 0,015 $mg.mL^{-1}$, ou de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 $mg.L^{-1}$ e determina-se as respectivas absorbâncias para cada concentração (eixo y), e após se encontra a equação de regressão da curva (y = ax + b). A curva resulta na concentração em $mg.mL^{-1}$ ou $mg.L^{-1}$.

Curva padrão de catequina ($C_{15}H_{14}O_6$)

1. Pesar 5 mg de catequina, transferindo para balão volumétrico de 25 mL, e completar o volume com metanol (solução mãe).

2. Após se realiza as diluições retirando alíquotas (100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µL), e transferir cada alíquota para balões volumétricos de 2 mL e completar o volume com metanol.

3. Pipetar 1 mL da solução para tubo de Falcon de 15 mL, adicionar 4 mL de água destilada, mais 300 µL de solução 5% (m/v) de $NaNO_2$, agitar em vórtex por 10 segundos, e deixar em repouso por 5 minutos.

4. Após adicionar 300 µL de solução de $AlCl_3$ 10% (m/v), agitar em vórtex por 10 segundos, deixar em repouso por 5 minutos, e adicionar 2 mL de solução de NaOH 1 M.

5. Após realizar a leitura em espectrofotômetro a 510 nm.

6. Fazer um branco utilizando o mesmo procedimento, substituindo o volume da solução padrão pelo mesmo volume de água destilada.

Obs. Zerar o aparelho com metanol.

Determinação da equação de regressão da curva padrão

Plotar a concentração de catequina em µg (eixo x) versus a absorbância (eixo y) e encontrar a equação de regressão (y = ax + b).

Inicialmente se tem 5 mg de catequina em 25 mL, ou seja, 0,2 $mg.mL^{-1}$. Ao retirar as alíquotas de 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; e 1,50 mL, e completar o volume a 2 mL, se obtém respectivamente 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,10; 0,125; e 0,15 $mg.mL^{-1}$. Após retira-se 1 mL de cada solução para reagir, em um total de 7,6 mL, assim se obtém respectivamente 1,316; 3,289; 6,579; 9,868; 13,158; 16,447; e 19,737 $\mu g.mL^{-1}$ de catequina (eixo x) e determina-se para cada concentração a absorbância respectiva (eixo y). A curva resulta na concentração em $\mu g.mL^{-1}$.

Curva padrão de colesterol ($C_{27}H_{46}O$)

1. Pesar 100 mg de colesterol e dissolver em 100 mL de clorofórmio.

2. Pegar diferentes alíquotas da solução de colesterol (0,1; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mg), e continuar o procedimento.

3. Realizar a saponificação das amostras, colocando as amostras em erlenmeyer de 250 mL, adicionar 25 mL de solução de KOH alcóolico 1,5 N, homogeneizar periodicamente por 1 hora, e deixar em repouso no escuro por 18 horas.

4. Após transferir para funil de separação, lavando o frasco com 50 mL de água e 50 mL de éter etílico, tampar, agitar, deixar em repouso até separação das fases, transferindo a fase inferior para outro funil.

5. Lavar a fase aquosa (inferior) com 50 mL de éter, e lavar a fase etérea (superior) com 50 mL de água; agitar, separar as fases novamente.

6. Transferir as fases etéreas para recipiente previamente tarado, evaporar até reduzir a fase líquida, adicionar 3 mL de acetona, evaporar até secar (abaixo de 60 ^0C), esfriar, pesar.

7. Dissolver o resíduo com clorofórmio, transferindo para balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com clorofórmio.

8. Pegar 2 mL dos resíduos em clorofórmio, e colocar em proveta de 25 mL com rolha esmerilhada, adicionar 1 mL de ácido acético glacial, mais 2 mL de anidrido acético, mais 0,2 mL de ácido sulfúrico concentrado, completar o volume a 20 mL com clorofórmio, e tampar a proveta.

9. Agitar, deixar em repouso em lugar escuro por 25 minutos, e realizar a leitura das alíquotas em espectrofotômetro a 625 nm.

10. Fazer um branco utilizando o mesmo procedimento, substituindo o volume da solução padrão pelo mesmo volume de água destilada.

Obs. Zerar o aparelho com água.

Determinação da equação de regressão da curva padrão

Determinar a equação de regressão (y = ax + b), plotando a concentração de colesterol em mg (eixo x) versus absobância (eixo y).

Inicialmente se tem 100 mg de colesterol nos 100 mL, ou seja, 1 $mg.mL^{-1}$. Ao retirar as alíquotas de 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 mL, e completar o volume a 50 mL, se obtêm respectivamente 0,002; 0,01; 0,02; 0,06; e 0,1 $mg.mL^{-1}$. Após retira-se 2 mL de cada solução para reagir, em um total de 10 mL, assim se obtém respectivamente 0,0002; 0,001; 0,002; 0,006; e 0,01 $mg.mL^{-1}$ de colesterol (eixo x) e determina-se para cada concentração a absorbância respectiva (eixo y). A curva resulta na concentração em $mg.mL^{-1}$.

Curva padrão de ferro (Fe)

1. Colocar volumes diferenciados de solução padrão de ferro contendo de 0,010; 0,025; 0,050; 0,075; e 0,10 mg de Fe, em balões de 50 mL, completando o volume com água.

2. Pipetar 10 mL de cada uma das soluções de ferro em béquer, adicionar 1 mL de cloridrato de hidróxilamina a 10% (m/v), aquecer sob ebulição por 10 minutos, esfriar, transferir para balão volumétrico de 50 mL, adicionar 5 mL de solução tampão de acetato:ácido acético, e 2 mL de solução de dipiridila a 0,1%, e completar o volume com água.

3. Realizar a leitura em espectrofotômetro (após 10 minutos do desenvolvimento da cor vermelha) a 510 nm.

4. Fazer um branco utilizando o mesmo procedimento, substituindo o volume da solução padrão pelo mesmo volume de água destilada.

Obs. Zerar o aparelho com água.

Determinação da equação de regressão da curva padrão

Determinar a equação de regressão (y = ax + b), plotando a concentração de ferro em mg (eixo x) versus absobância (eixo y).

Inicialmente se tem 0,0002; 0,0005; 0,001; 0,0015; e 0,002 $mg.mL^{-1}$. Após retira-se 10 mL de cada solução para reagir, em um total de 50 mL, assim se obtém respectivamente 0,00004; 0,0001; 0,0002; 0,0003; e 0,0004 $mg.mL^{-1}$ de ferro (eixo x) e determina-se para

cada concentração a absorbância respectiva (eixo y). A curva resulta na concentração em $mg.mL^{-1}$.

Curva padrão de glicose ($C_6H_{12}O_6$)

1. Pesar 1 g de glicose em balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada, após diluir a amostra para obter concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 mg de glicose / 100 mL.

2. Pipetar 1 mL de cada amostra em tubo de ensaio e adicionar 1 mL do reativo de Somogyi, levar em banho maria por 10 minutos e esfriar.

3. Adicional 1 mL de reativo de Nelson e 7 mL de água, e a seguir fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 535 nm.

4. Fazer um branco utilizando o mesmo procedimento, substituindo o volume da solução padrão pelo mesmo volume de água destilada.

Obs. Zerar o aparelho com água.

Determinação da equação de regressão da curva padrão

Determinar a equação de regressão (y = ax + b), plotando a concentração de glicose em µg (eixo x) versus absobância (eixo y).

Inicialmente se tem 1 g de glicose em 100 mL, ou seja, 10 $mg.mL^{-1}$. Após retira-se alíquotas de 200, 400, 600, 800 e 1000 µL e completa-se o volume a 100mL, assim se obtém respectivamente 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; e 0,10 $mg.mL^{-1}$ de glicose. Após se retira 1 mL de cada solução e se leva para reagir em um volume total de 10 mL, o que perfaz respectivamente 0,002; 0,004; 0,006; 0,008; e 0,010 $mg.mL^{-1}$ de glicose, ou 2, 4, 6, 8, e 10 $\mu g.mL^{-1}$ de glicose (eixo x), e determina-se para cada concentração a absorbância respectiva (eixo y). A curva resulta na concentração em $\mu g.mL^{-1}$.

Curva padrão de tocoferóis (α, β, γ, δ)

1. Pesar 1 g de glicose em balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada, após diluir a amostra pipetando 200, 400, 600, 800 e 1000 µL da solução em balão volumétrico de 100 mL, e completar o volume com água.

2. Transferir cerca de 1 mL para tubos de eppendorf, centrifugar à 9000 rpm por 6 minutos ou filtrar com filtros de 0,4 µm.

3. Retirar uma alíquota do sobrenadante e injetar no cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), tendo coluna de fase normal e acoplado ao detector de fluorescência.

4. Utilizar o fluxo de 1 mL / minuto de uma fase móvel isocrática de hexano : isopropanol, 98,5:1,5 (v/v).

Determinação da equação de regressão da curva padrão

Plotar a concentração dos tocoferóis de cada alíquota injetada no HPLC, em µg (eixo x) versus a absorbância (eixo y) e encontrar a equação de regressão (y = ax + b).

Curva padrão de Trolox (ácido 6- hidróxi 2,5,7,8 - tetrametilicromano -2-carboxílico - $C_{14}H_{18}O_4$) para DPPH

1. Preparar diferentes concentrações da solução de Trolox a 2000 µM, retirando diferentes alíquotas (100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µL), e leva-se cada alíquota para balões volumétricos de 2 mL e completa-se o volume com metanol.

2. Pipetar 100 µL das soluções em tubos de Falcon de 10 mL, e adicionar 3,9 mL da solução de trabalho de DPPH (0,06 mM), para completar o volume de 4 mL.

3. Homogeneizar as misturas em vórtex por 30 segundos, deixar em repouso por 60 minutos no escuro, e fazer a leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm.

4. Fazer um branco utilizando 100 µL de metanol em 3,9 mL da solução trabalho (0,06 mM) de DPPH.

Obs. Zerar o equipamento com metanol.

Determinação da equação de regressão da curva padrão

Plotar as concentrações da solução padrão (eixo x) versus a Absorbância (eixo y), e encontrar a equação de regressão (y = ax + b).

Utilizando a solução de Trolox a 2000 µM, se tem 0,5 $mg.mL^{-1}$. Ao retirar alíquotas desta solução de 100, 250, 500, 750, 1000 e 1500 µL, se obtém respectivamente 0,05, 0,125, 0,25, 0,375, 0,50 e 0,75 mg, e ao completar o volume a 2 mL, se obtém 0,025; 0,0625; 0,125; 0,1875; 0,250; e 0,375 $mg.mL^{-1}$. Durante o procedimento foi utilizado 100 µL de cada uma das soluções, e misturado com 3,9 mL de DPPH, totalizando 4 mL de solução. Assim, se obtêm as concentrações na curva (eixo x) de 0,000625; 0,0015625; 0,003125; 0,0046875; 0,00625; e 0,009375 $mg.mL^{-1}$, e determina-se as respectivas absorbâncias para cada concentração (eixo y), e após se encontra a equação de regressão da curva (y = ax + b). A curva resulta na concentração em $mg.mL^{-1}$. Pode se fazer a curva em $mol.L^{-1}$, onde se tem respectivamente 0,625; 1,5625; 3,125; 4,6875; 6,25; e 9,375 $mg.L^{-1}$, que em mol equivale respectivamente a (0,625 mg x 1 mol / 250000 mg) 0,0000025 $mol.L^{-1}$ (0,0025 $mmol.L^{-1}$ ou 2,5 $\mu mol.L^{-1}$, ou seja, 0,0025 mM ou 2,5 µM); 0,00000625 $mol.L^{-1}$ (0,00625 $mmol.L^{-1}$ ou 6,25 $\mu mol.L^{-1}$, ou seja, 0,00625 mM ou 6,25 µM); 0,0000125 $mol.L^{-1}$ (0,0125 $mmol.L^{-1}$ ou 12,5 $\mu mol.L^{-1}$, ou seja, 0,0125 mM ou 12,5 µM); 0,00001875 $mol.L^{-1}$ (0,01875 $mmol.L^{-1}$ ou 18,75 $\mu mol.L^{-1}$, ou seja, 0,01875 mM ou 18,75 µM); 0,000025 $mol.L^{-1}$ (0,025 $mmol.L^{-1}$ ou 25 $\mu mol.L^{-1}$, ou seja, 0,025 mM ou 25 µM); e 0,0000375 $mol.L^{-1}$ (0,0375 $mmol.L^{-1}$ ou 37,5 $\mu mol.L^{-1}$, ou seja, 0,0375 mM ou 37,5 µM). A concentração da curva pode ser expressa em $mg.mL^{-1}$, $mmol.L^{-1}$ (mM), ou $\mu mol.L^{-1}$ (µM).

Curva padrão de Trolox (ácido 6- hidróxi 2,5,7,8- tetrametilicromano -2-carboxílico - $C_{14}H_{18}O_4$) para ABTS

1. Preparar diferentes concentrações da solução de Trolox a 2000 µM, retirando diferentes alíquotas (100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µL), e leva-se cada alíquota para balões volumétricos de 2 mL e completa-se o volume com metanol.

2. Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de 30 µL de cada solução de trolox para tubos de ensaio, misturar com 3,0 mL da solução do radical ABTS e homogeneizar em agitador de tubos.

3. Realizar a leitura após 6 minutos da mistura a 734 nm.

4. Fazer um branco utilizando o mesmo procedimento substituindo 30 µL de água pela solução padrão.

Obs. Zerar o equipamento com metanol.

Determinação da equação de regressão da curva padrão

Plotar as concentrações da solução padrão (eixo x) versus a Absorbância (eixo y), e encontrar a equação de regressão (y = ax + b), usando o mesmo procedimento adotado na curva do DPPH, fazendo as substituições pelas diluições da técnica. A concentração pode ser expressa em $mg.mL^{-1}$, $mmol.L^{-1}$ (mM) ou $\mu mol.L^{-1}$ (µM).

Curva padrão de Trolox (ácido 6-hidróxi 2,5,7,8 - tetrametilicromano -2-carboxílico - $C_{14}H_{18}O_4$) para FRAP

1. Preparar diferentes concentrações da solução de Trolox a 2000 µM, retirando diferentes alíquotas (100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µL), e leva-se cada alíquota para balões volumétricos de 2 mL e completa-se o volume com metanol.

2. Em ambiente escuro, pipetar 90 µL de solução padrão em tubo de Falcon de 15 mL, acrescentar 270 µL de água destilada e 2,7 mL da solução do reagente FRAP.

3. Homogeneizar em agitador de tubos e levar ao banho maria a 37 ^oC, mantendo por 30 minutos.

4. Fazer a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

5. Fazer um branco utilizando o mesmo procedimento substituindo 90 µL de água pela solução padrão.

Obs. Zerar o aparelho com água.

Determinação da equação de regressão da curva padrão

Plotar as concentrações da solução padrão (eixo x) versus a Absorbância (eixo y), e encontrar a equação de regressão (y = ax + b), usando o mesmo procedimento adotado na curva do DPPH, fazendo as substituições pelas diluições da técnica. A concentração pode ser expressa em $mg.mL^{-1}$, $mmol.L^{-1}$ (mM) ou $\mu mol.L^{-1}$ (µM).

Curva padrão de Trolox (ácido 6-hidróxi 2,5,7,8- tetrametilicromano-2-carboxílico - $C_{14}H_{18}O_4$) para ORAC

Preparar diferentes concentrações da solução de Trolox a 2000 µM, retirando diferentes alíquotas (100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µL), e leva-se cada alíquota para balões volumétricos de 2 mL e completa-se o volume com solução tampão fosfato.

1. Adicionar 250 µL da solução Trolox em tubo de Falcon de 5 mL, acrescentar 1500 µL de solução de fluoresceína 4 nmol. L^{-1}, e manter sob proteção da luz a 37º C em banho maria.

2. Após adicionar 250 µL de solução de AAPH (160 mmol. L^{-1}), e imediatamente fazer a leitura da intensidade de fluorescência, em fluorímetro, no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 515 nm.

3. Realizar as leituras durante 30 minutos, em intervalos de 1 minuto, e após os 30 minutos de leitura da amostra, a intensidade de fluoresceína deve ser menor que 10% do seu valor inicial. Caso isso não ocorra, é necessário ajustar a concentração da solução a ser analisada.

4. Para o branco fazer o mesmo procedimento, substituindo o Trolox pela solução tampão de fosfato.

Obs. Zerar o aparelho com solução tampão fosfato.

Plotar em um gráfico a intensidade de fluorescência x tempo em minutos. Após calcular a área sob a curva (AUC) para cada uma das concentrações, pela equação:

$$\mathbf{AUC = (1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \ldots + f_{(n+1)}/f_0)}$$

Onde: f_0 = intensidade de fluorescência inicial, e fn = intensidade de fluorescência no tempo n.

Plotar um gráfico da área líquida ($AUC_{líquida}$) no eixo y versus concentração no eixo x, para obter a equação de regressão (y = ax + b).

Obs. A área líquida é calculada para a solução padrão, descontando-se o valor de AUC do branco (Área Líquida = AUC_{Trolox} - AUC_{branco}).

As concentrações são calculadas usando o mesmo procedimento adotado na curva do DPPH, fazendo as substituições pelas diluições da técnica. A concentração pode ser expressa em $mg.mL^{-1}$, $mmol.L^{-1}$ (mM) ou $\mu mol.L^{-1}$ (µM).

REFERÊNCIAS

[1] ADAD, J.M.T. **Controle Químico de Qualidade**. Rio de Janeiro: ed. Guanabara dois S.A., 1982. 204p.

[2] ANGELUCCI, E.; CARVALHO, C. **Análises químicas de alimentos- Manual Técnico.** Campinas: ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. 171p.

[3] ANVISA. **Resolução RDC nº 429 de 8 de outubro de 2020**. Anvisa, 2020.

[4] ANVISA. **Instrução normativa- IN nº 75 de 8 de outubro de 2020**. Anvisa, 2020.

[5] AOAC. **Official Methods of analysis**. Washington DC.: 15ed. Association of Official Analytical Chemists, 1990.

[6] AOCS. American Oil Chemists´ Society. **Official and tentative methods of the American Oils Chemists' Society**, Champaign, IL., 1992.

[7] BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity**. LWT - Food Science and Technology, v. 28, p. 25–30, 1995.

[8] CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1999. 212p.

[9] INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. v 1. São Paulo: O Instituto, 1985. 533p.

[10] JONG, E.V.; CARVALHO, H.H.; BELLÓ, R.M.; SOUZA, R.B.; TERRA, M.F. **Alimentos: Métodos físicos e químicos de análise**. Porto Alegre: UFRGS, 2002. 180p.

[11] LANARA. **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II Métodos Físicos e Químicos**. Brasília, DF, 1981.

[12] LICHTENTARE, H.K.C. **Chlorophylls and carotenoids- Pigments of phtosyntetic biomembranes.** In Methods in enzymology. San Diego: Academic Press. 1987.

[13] MIRANDA, L.C.G.; DE BATTISTI, C.R. **Práticas de química bromatológica**. Viçosa: UVF, 1981. 41p.

[14] MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. 2 ed. São Paulo: Edgar Blucher, 1995. 629p.

[15] NIELSEN, S.S. **Introduction to the Chemical Analysis of foods**. London: Jone and Bartlett Publishers, Inc., 1994. 530p.

[16] NELSON, N. A **photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose**. Journal of Biologic Chemistry, Bethesda, Md, v. 153, n. 2, p. 375-380, Feb. 1960.

[17] POMERANZ, Y. & MELOAN, C.E. **Food analysis: Theory and practice**. 2nded., New York: AVI, 1987. 797p. Re et al. (1999)

[18] RODRIGUEZ-AMAYA,D.B. **A guide to carotenoids analysis in foods**. ILSI Press: Washington, 1999. 64p.

[19] RUFINO, M.D.S.M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Comunicado técnico. Embrapa, Fortaleza- CE. 2006.

[20] RUFINO, M.D.S.M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Embrapa Agroindústria tropical. Cominicado Técnico. 2007.

[21] SACRAMENTO, V.V.; VELOSO, P.H.F.; ROYO, V.A. **Métodos para determinação de capacidade antioxidante**. Ponta Grossa - PR: Atena, 2023.

[22] SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A.J.R. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.** American Journal of Enology and Viticulture, v.16, p.144-158, 1965.

[23] ZAMBIAZI, R.C. **The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability**. Winnipeg: University of Manitoba, 1997. 304p.

[24] ZAMBIAZI, R.C. **Análise físico química de alimentos**. Pelotas: Editora UFPel, 2010. 202p.

[25] ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effectes on superoxide radicals.** Food Chemistry, v. 64, p. 555–559, 1999.

@editorapoisson

www.poisson.com.br
contato@poisson.com.br

https://www.facebook.com/editorapoisson